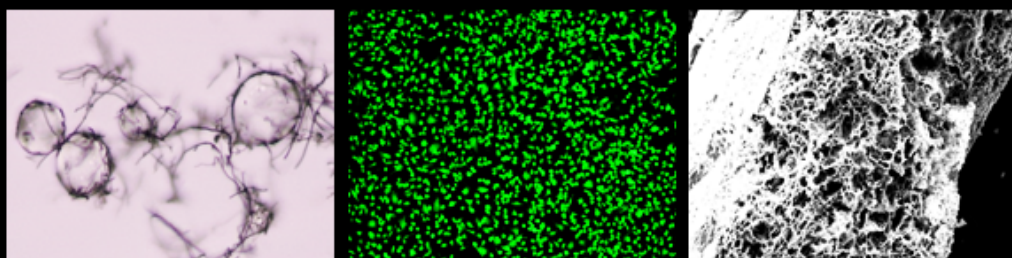


Polivinilpirrolidonas aminadas: síntesis, caracterización y aplicaciones en los campos biomédico y tecnológico



Tesis doctoral
Anselmo del Prado Abellán

Madrid, 2016



**Departamento de
Química Orgánica**



**Instituto de Ciencia y
Tecnología de Polímeros**

Polivinilpirrolidonas aminadas: síntesis, caracterización y aplicaciones en los campos biomédico y tecnológico

Tesis doctoral presentada por:

Anselmo del Prado Abellán

Directores:

Dr. Carlos Elvira

Dr. Helmut Reinecke

Madrid, 2016



**Organic Chemistry
Department**



**Institute of Polymer
Science and Technology**

Aminated polyvinylpyrrolidones: synthesis, characterization and applications in biomedical and technological fields

PhD dissertation presented by:

Anselmo del Prado Abellán

Advisors:

Dr. Carlos Elvira

Dr. Helmut Reinecke

Madrid, 2016

Dr. Carlos Elvira Pujalte, Doctor en Ciencias Químicas y Científico Titular del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid, y **Dr. Helmut Reinecke**, Doctor en Ciencias Naturales e Investigador Científico del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid

CERTIFICAN:

1. Que la tesis doctoral titulada **“Polivinilpirrolidonas aminadas: síntesis, caracterización y aplicaciones en los campos biomédico y tecnológico”** presentada por el Licenciado en Química **D. Anselmo del Prado Abellán** para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Química Macromolecular Aplicada, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo su supervisión.
2. Que la presente tesis doctoral cumple con todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid con Mención Internacional.

De acuerdo con la normativa vigente, y como directores de la mencionada tesis doctoral, firmamos el presente certificado por el que se autoriza su presentación y defensa.

En Madrid, a 14 de Febrero de 2016.

Dr. Carlos Elvira Pujalte

Dr. Helmut Reinecke

A mis padres

“La imaginación es más importante que el conocimiento. El conocimiento es limitado y la imaginación circunda el mundo”.

Albert Einstein (1879-1955)

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”.

Mahatma Gandhi (1869-1948)

Esta tesis doctoral ha sido financiada mediante el proyecto MAT2010-20001 del Ministerio de Economía y Competitividad, y con la beca predoctoral de Formación del Personal Investigador BES-2011-045833.



El desarrollo del trabajo realizado en esta tesis fue llevado a cabo en el Grupo de Funcionalización de Polímeros, del departamento de Química Macromolecular Aplicada del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC.



Programa de Doctorado en Química Orgánica del RD 99/2011, del departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid.



Parte del trabajo descrito en esta tesis se realizó en estancias en el extranjero, financiadas con las ayudas para las estancias breves del programa de becas FPI del Ministerio de Economía y Competitividad. Los grupos de trabajo fueron:



- Network of Excellence for Functional Biomaterials (NFB) de la Universidad Nacional de Irlanda, Galway (NUI-Galway), bajo la supervisión de Dr. Wenxin Wan y Dr. Abhay Pandit.



- Braslau Research Group, de la Universidad de California, Santa Cruz (UCSC), en Estados Unidos, bajo la supervisión de la Prof. Rebecca Braslau.

- Levkin Research Group, del Instituto Tecnológico de Karlsruhe (KIT), en Alemania, bajo la supervisión de Dr. Pavel Levkin.



Además, parte del trabajo también se hizo en colaboración con grupos de investigación españoles, como con el grupo de Ingeniería de Tejidos de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), bajo la supervisión de Prof. Jose Luis López Lacomba, así como con el grupo de Glicoquímica Biológica del Instituto de Química Orgánica General del CSIC.



Agradecimientos

El hecho de hacer una tesis doctoral no sólo implica ponerse una bata, coger una espátula y mezclar liquiditos y polvos en un laboratorio a ver qué sale. Tras las horas intensas de trabajo, siempre hay una parte social y de relaciones entre compañeros y amigos, la cual aunque parezca un poco “postureo” es de las más importantes a la hora de escribir unas conclusiones de tal experiencia. Por ello, me gustaría dar las gracias a todos aquellos que han participado de alguna manera en estos cuatro años y cuatro meses de tesis (bueno, tengo que sumar también el año anterior de empezarla, que asistí al famoso máster de Plásticos y Caucho, tan irritante para nosotros los alumnos pero, eso sí, productivo).

Para comenzar con los agradecimientos, qué menos que dedicarle el primer puesto a mi grupo FUPOL (Grupo de Funcionalización de Polímeros, para el que no lo sepa aún). Gracias a mis directores de tesis, los doctores Carlos Elvira y Helmut Reinecke, aunque me gustaría decir que el doctor Alberto Gallardo estuvo igual de implicado en esta tesis que ellos, siendo tres jefes increíbles (aunque cada cual tiene lo suyo, ¿no? pero son majetes). Gracias a Pine por ayudarme con los temas relacionados con las celulillas y de las estancias. Me has enseñado que la ciencia no sólo está en saber mucho sino que también son importantes las colaboraciones entre “colegas” de otros grupos, y así aprender y enseñar un poco de todo en cualquier sitio (y ya pues sacar algún proyectillo conjunto). Gracias a Helmut por ayudarme a confirmar mi pasión y “frikismo” por la síntesis y la química orgánica, pasión que creo que ambos compartimos y nos gusta tanto, que nos motiva día a día, aunque a veces huele un poco mal con tanto tiol. Gracias a Alberto por enseñarme tanto sobre materiales y polimerizaciones; tus ideas son muy buenas y super chulas, aunque a veces te odio por tener tantas!!

Desde el principio de mi estancia en FUPOL (hace ya más de cinco años), por el grupo han pasado muchas personas, y quería agradecerles a todos que, de alguna manera u otra, han contribuido positivamente al desarrollo de este trabajo. Myriam, Rodrigo, María, Inma, Juan Alfonso, Mercedes, y todos los estudiantes de máster o intercambio que han pasado (Numan, Paca, Tülin, Melike, Jose, Laetitia). Gracias de manera especial a Rodri por esas charlas frikis sobre química y síntesis orgánica que nos amenizaban el día a nuestra manera ‘nerdy’ total, así como su simpatía y sus ganas que transmitía un positivismo increíble. Gracias también a Juan Alfonso (JAR), amante de la salsa y de Naruto Shippuden, por alegrar alguna vez que otra la jornada de trabajo con alguna parida; creo que eres muy buena persona y me alegra mucho que ahora mismo estés donde estás y que te esté yendo bien. Gracias también a María que, aunque la odiase ‘con cariño’ al principio por tener que hablar siempre en inglés en el labo, en las charlas y reuniones de grupo, me ayudó mucho a soltarme con el inglés, además de divertirme mucho con ella en cualquier momento del día. Gracias a Myriam por su ayuda para simpatizar al principio del todo con la VP (nuestra gran compañera de vida), aunque una pena que la conociese un poquito mejor justo al final. Y gracias también a Inma (por su ayuda con las partículas y sus consejos de yoga y relax que tanto he necesitado en esta última fase tan estresante) y a Mercedes (que los lunes sin sus

‘aaaaay’ no son lo mismo). De todas formas, ahora comienza una nueva etapa, un FUPOL 2.0, con Felipe Reviriego y Elma, con los que he pasado buenos ratos con ellos, aunque a veces dudaba si estaba en el laboratorio 108 o en el plató de Sálvame Deluxe. Bueno, y gracias enormes también a Carol, que me ha ayudado mucho con el GPC y con el resto de la caracterización, y sus consejos siempre venían en algún momento indicado, además de pasar ratos divertidos con ella y su amiga la 2-hidroxietilpirrolidina.

El grupo del taper también se merece su mención especial y agradecimientos, aunque ha pasado tantísima gente que sería imposible nombrarlos a todos. Buenos ratos con Hilda (mi chuli), Laura Ramos, Camino, Carol, Isabel, Aurora, Virginia, Vanesa, Belén, Miryam, Antonio, Mónica, Marta Palacios, Nicoletta, Susana... y todos aquellos que han venido de estancia (como Juansito, Talitha, Merari, Laura,...) y un montón de buena gente con la que compartir un taper precalentado al microondas suponía pasar un buen rato.

También hacer mención de personas especiales a las que he conocido muy gustosamente estando en el ICTP, como Maite, Mariola, Ester, Jon, Coro, Rubén, Bea, Felisa, Sandra, Guiomar, Alberto Sanz, Patricia, Vanesa, Alberto Mejía, Eli, Serena, Marta Álvarez, Alicia, Iván, Valentina... Gracias también a todo el personal investigador que forma parte del centro que me ayudó en algún momento de esta tesis (Mayoralas, Ágatha, Isra, Isabel, Elisa, Juan Rodríguez, Marta Fernández, Isabel Quijada, Maite, Araceli). Y gracias también a administración, Lourdes y María Jesús, por su ayuda con el papeleo cuando estaba de estancia, aunque más de una vez me ha dolido la cabeza pensando en MJ...

I would like to thank to Dr. Pandit (Galway, Irlanda), Prof. Braslau (Santa Cruz, California) and Dr. Levkin (Karlsruhe, Germany) for give me the chance to visit their group, and work with them learning and improving my experience and knowledge in other fields in polymer science. During my stays abroad, I met many people who were so helpful and nice with me. They made me feel like one more of them. I would like to mention Ryan, Aideen, Ben, Jacqui, Robert, Michael, Tianyu, Vicky, Maciek, Ligia, Diana, Joshua, Luis, Kieran, Gianluca, Stelle, Pramod, Aniket, Sigal, Tvsika, Waqar... all special people I met in Galway during those three intense months. Also in California I met nice people, like Chad, Ian, Aruna, Jen, Wiley, Elliot, Marc, and Rebecca, a lovely woman and the nicest and ‘hippie’ boss I ever met. In my last stay abroad, in Karlsruhe, I met people: Danuta, Victoria and Girish, who made the time flyes in the office with their company. Also special mention to Konny, Isabel, Anna, Jan, Hatice, Claire, Wenqian and Xin. Thank you so much for doing my stay there easier and funny in you company.

Y no hace falta irse fuera para estar en buena compañía! En el Instituto de Estudios Biofuncionales de la UCM conocí a gente muy maja, como Ana Civantos (ahora también special member de FUPOL), Kike, Vivi, Ana ‘dospun’, Laura, Isabel, David, Marian, María, Yamila y Luciano. Pasé un par de meses trabajando con ellos y fue genial. Todo descanso para café tenía su postre rico. Lástima que las celullillas no me caigan tan bien...

Gracias también a mis amigos que por suerte me rodean y que durante este periodo hemos pasado buenos momentos. Tanto a aquellos a los que he conocido al llegar a Madrid, como Miguel, Félix, Alberto, Paco, Borja, Jose, Pablo, Víctor, Carlos, Iván, Jaime, Luis, Jorge y Julio, como a aquellos que traía en la mochila desde Salamanca (Nono, Dani, Rubén y Javi), a todos gracias por compartir momentos inolvidables de esta época de mi vida en la que siempre estaréis presentes, y espero que vivamos muchas experiencias buenas en el futuro.

Y agradecer por último a mi familia, que durante estos cinco años y pico hemos vivido y sobrevivido múltiples situaciones, algunas mejores que otras, pero que siempre habéis estado ahí apoyándome en todo, y siempre sintiéndome muy orgulloso de dónde vengo. Tres nuevos miembros se han sumado a la familia en estos años, mis sobris mellis Alberto y Minerva, y el último mi ahijado Alberto, de los cuales me siento muy afortunado. Nunca tendré palabras suficientes para agradecer todo lo que mi madre y mi padre me han ayudado y confiado en mí, educándome y enseñándome con humildad a trabajar duro y a dar valor a esas cosas que con tanto esfuerzo cuesta conseguirlas. Y por eso, esta tesis doctoral se la dedico especialmente a ellos, fruto del esfuerzo y de las ganas que ellos me han transmitido desde siempre.

ABREVIATURAS

2PE	2-fenoxietanol
A	Área
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIBN	2,2'-azobisisoburitonitrilo
AOEMA	Metacrilato de 2-(acriloiloxietilo)
ATR	Reflectancia total atenuada
BMA	Metacrilato de butilo
Boc ₂ O	Di-terc-butildicarbonato
C	Control
C _M	Cadenas de polímero ricas en metacrilato
CF ₃ COOH	Ácido trifluoroacético
CNF	Nanofibras de carbono
C _t	Constante de transferencia
C _V	Cadenas de polímero ricas en N-vinil-2-pirrolidona
D	Índice de dispersidad
DEAEM	N,N-dietilaminoetil metacrilato
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMA	N,N-dimetilacetamida
DMAEM	N,N-dimetilaminoetil metacrilato
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle Medium</i> (Medio de cultivo celular)
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
\overline{DP}_n	Grado de polimerización
\overline{DP}_{n0}	Peso molecular de referencia en reacción sin transferencia
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ee	Exceso enantiomérico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPyM	Metacrilato de etilpirrolidina
EtOH	Etanol
ESI	Ionización por electrospray
F	Relación molar de monómeros en la alimentación
f	Relación molar de monómeros en el copolímero
FBS	Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
GPC	Cromatografía de permeación en gel
H	Hinchamiento
HCPK	1-hidroxi ciclohexil fenil cetona

HEMA	Hidroxietil metacrilato
HMSO	Hexametildisiloxano
HPMA	Hidroxipropil metacrilamida
I	Iniciador
I●	Centro activo primario
IEP	Punto isoelectrico
k_{ij}	Constante cinética de reacción del monómero M_j con una cadena en crecimiento acabada en el monómero M_i
k_p	Constante cinética de propagación
k_t	Constante cinética de terminación
k_{tr}	Constante cinética de transferencia
LDA	Diisopropilamiduro de litio
LCST	<i>Lower critical solution temperature</i>
M	Monómero (Anexo 2), Plásmido libre (Cap. 4), Metacrilato genérico (Cap. 6)
\bar{M}_n	Peso molecular promedio en número
m_h	Masa de la muestra tras el tratamiento
m_s	Masa de la muestra seca
MS	Espectrometría de masas
MECK	Cromatografía electrocinética micelar
MMA	Metacrilato de metilo
MV	Entrecruzante Metacrilato-Vinilpirrolidona estable
MVhid	Entrecruzante Metacrilato-Vinilpirrolidona hidrolizable
N/P	Relación nitrógeno/fósforo
NIPAAm	N-isopropilacrilamida
NPs	Nanopartículas
NVC	N-vinilcaprolactona
PAGA	Poli-(ácido α -(4-aminoetil)-L-glicólico)
PAMAM	Poliamidoamina
$P_n\bullet$	Centro activo en crecimiento con n unidades monoméricas
$P_m\bullet$	Centro activo en crecimiento con m unidades monoméricas
P_{n+m}	Cadena “muerta” de polímero con n+m unidades monoméricas
P_n	Cadena “muerta” de polímero con n unidades monoméricas
P/S	Penicilina/Estreptomicina
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol
PEGMA	Metacrilato de polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PHPMA	Poli-(hidroxipropil metacrilamida)
PLL	Poli-L-lisina

PMI	N-fenilmaleimida
PMMA	Polimetil metacrilato
PPE	Poli fosfoésteres
PVA	Polivinil alcohol
PVP	Poli-(N-vinilpirrolidona)
py	Piridina
r	Relación de reactividad
R	Porcentaje de liberación de 2PE
R_p	Velocidad de propagación
R_t	Velocidad de terminación
R_{tr}	Velocidad de transferencia
RMN	Resonancia megnética nuclear
r_0	Radio de la muestra antes del tratamiento
r_t	Radio de la muestra tras el tratamiento
SEM	Microscopía electrónica de barrido
T	Agente de transferencia
T●	Centro activo en crecimiento tras la transferencia
t.a.	Temperatura ambiente
T_g	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TsCl	Cloruro de p-toluensulfonilo
UCST	<i>Upper critical solution temperature</i>
URLs	Unidades relativas de luminiscencia
VA	Acetato de vinilo
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VP	N-vinil-2-pirrolidona
w	Fracción en peso

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. Polivinilpirrolidona.....	3
2. Funcionalización de PVP.....	4
3. Las aminas como grupos funcionales.....	8
4. Polimerización radical convencional de VP.....	9
5. Hipótesis y objetivos de la tesis.....	11
6. Bibliografía.....	12
 CAPÍTULO 1: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MONÓMEROS AMINADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA N-VINIL-2-PIRROLIDONA.....	 17
1. Introducción.....	19
2. Experimental.....	21
2.1. Reactivos.....	21
2.2. Síntesis y caracterización de monómeros.....	21
2.2.1. Derivados mono-alkilados de VP.....	21
2.2.2. Derivados VP-amina a partir de VPBr.....	22
2.2.3. Azido derivados de pirrolidina, piperidina y piperazina.....	26
2.2.4. Azido derivado de L-prolina.....	28
2.2.5. Derivados VP-amina a partir de VPgyl.....	30
2.3. Síntesis y caracterización del entrecruzante asimétrico MVhid.....	32
2.4. Métodos y equipos.....	33
3. Resultados y discusión.....	34
4. Conclusiones.....	35
5. Bibliografía.....	35
 CAPÍTULO 2: PVP FUNCIONALIZADA CON AMINA PRIMARIA Y SU POSIBLE APLICACIÓN EN LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS.....	 37
1. Introducción.....	39
2. Experimental.....	41
2.1. Reactivos.....	41
2.2. Polimerizaciones.....	41
2.3. Métodos y equipos.....	42
2.3.1. Estudio de la sensibilidad al pH de los polímeros aminados.....	42
2.3.2. Hidrólisis del conjugado PVP-2PE.....	42
2.3.3. Otros métodos.....	43
3. Resultados y discusión.....	44
3.1. Síntesis y caracterización de polímeros.....	44
3.2. Determinación de las relaciones de reactividad y descripción teórica del progreso de la polimerización.....	46

3.3. Estudio de la sensibilidad al pH de los polímeros aminados.....	47
3.4. Polímero obtenido a partir de VP-2PE.....	48
3.5. Hidrólisis del conjugado PVP-2PE.....	50
4. Conclusiones.....	52
5. Bibliografía.....	52

CAPÍTULO 3: POLÍMEROS SENSIBLES A LA TEMPERATURA Y/O AL PH BASADOS EN PVPS PORTADORAS DE AMINAS CÍCLICAS.....

1. Introducción.....	57
2. Experimental.....	59
2.1. Reactivos.....	59
2.2. Polimerizaciones.....	59
2.3. Métodos y equipos.....	60
2.3.1. Estudio de la sensibilidad al pH de los polímeros aminados.....	60
2.3.2. Análisis de la termosensibilidad de los polímeros aminados.....	61
2.3.3. Otros métodos.....	61
3. Resultados y discusión.....	62
3.1. Síntesis y caracterización de los polímeros obtenidos.....	62
3.2. Comportamiento dual estímulo-respuesta de los polímeros sintetizados frente a variaciones de temperatura y pH.....	64
4. Conclusiones.....	70
5. Bibliografía.....	70

CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN DE LOS POLÍMEROS DE PVP AMINADOS COMO AGENTES NO VIRALES DE TRANSFECCIÓN.....

1. Introducción.....	75
1.1. La terapia génica.....	75
1.2. Polímeros como vectores no virales.....	76
1.3. PVP como soporte de vectores aminados.....	78
2. Experimental.....	80
2.1. Reactivos.....	80
2.2. Polimerizaciones.....	81
2.3. Materiales y métodos.....	81
2.3.1. Formación y caracterización de <i>polyplexes</i> (complejos polímero-ADN).....	81
2.3.2. Análisis de la eficiencia de transfección y de la citocompatibilidad <i>in vitro</i> de los <i>polyplexes</i>	82
2.3.3. Análisis estadístico de los resultados.....	83
3. Resultados y discusión.....	83
3.1. Descripción de los polímeros y del estudio.....	83
3.2. Polímeros de PVP portadores de grupos -NH ₂	84
3.2.1 Análisis de los <i>polyplexes</i>	84

3.2.2. Estudio de la respuesta celular.....	86
3.3. Polímeros de PVP portadores de grupos pirrolidina, piperidina y piperazina.....	88
3.3.1. Análisis de los <i>polyplexes</i>	88
3.3.2. Estudio de la respuesta celular.....	90
4. Conclusiones.....	99
5. Bibliografía.....	100

CAPÍTULO 5: POLÍMEROS PORTADORES DE L-PROLINA Y SU POSIBLE APLICACIÓN COMO CATALIZADORES DE REACCIONES ORGÁNICAS EN AGUA.....

1. Introducción.....	103
1.1. L-prolina como catalizador en síntesis orgánica asimétrica.....	105
1.2. Sistemas poliméricos portadores de L-prolina.....	107
1.3. PVP como soporte de L-prolina.....	108
2. Experimental.....	109
2.1. Reactivos.....	109
2.2. Polimerizaciones.....	109
2.3. Métodos y equipos.....	111
2.3.1. Estudio de la sensibilidad al pH de los polímeros portadores de L-prolina.....	111
2.3.2. Evaluación de los polímeros portadores de L-prolina como catalizadores asimétricos en la reacción aldólica.....	111
2.3.3. Otros métodos.....	112
3. Resultados y discusión.....	112
3.1. Síntesis y caracterización de polímeros.....	112
3.2. Estudio de la sensibilidad al pH de los polímeros portadores de L-prolina en su forma desprotegida.....	116
3.3. Evaluación de los polímeros portadores de L-prolina como catalizadores asimétricos en la reacción aldólica.....	119
4. Conclusiones.....	123
5. Bibliografía.....	123

CAPÍTULO 6: USO DE LOS DERIVADOS DE VP AMINA PARA LA PREPARACIÓN SIMPLE DE SISTEMAS “AUTO-ORDENADOS” MEDIANTE SU COPOLIMERIZACIÓN CON VP Y METACRILATOS.....

1. Introducción.....	127
1.1. Preparación simple de interfaces y superficies catiónicas usando la VP portadora de sal de amina cuaternaria en la copolimerización “autoestabilizante” de MMA y VP.....	129
1.2. Uso del entrecruzante asimétrico hidrolizable para preparar redes anfifílicas reorganizables en agua.....	130
2. Experimental.....	133
2.1 Reactivos.....	135

2.2. Polimerizaciones.....	135
2.3. Métodos y equipos.....	136
2.3.1. Emulsiones líquido/líquido y esferas sólidas.....	136
2.3.2. Tratamiento de las redes en medio acuoso.....	136
2.3.3. Otros métodos.....	137
3. Resultados y discusión.....	137
3.1. Sistemas dispersos.....	137
3.1.1. Interfaces positivas.....	139
3.1.2. Superficies positivas.....	141
3.2. Redes.....	143
4. Conclusiones.....	147
5. Bibliografía.....	147
ANEXOS.....	149
Anexo 1.....	150
Anexo 2.....	161
Anexo 3.....	166
Anexo 4.....	173
Anexo 5.....	175
RESUMEN/ABSTRACT.....	177
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	187

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Polivinilpirrolidona

La poli-(N-vinilpirrolidona) (según la IUPAC poli-(N-vinilpirrolidinona)) o povidona, PVP (Figura I.1), es un polímero con un amplio número de aplicaciones, pudiéndose encontrar en numerosos artículos de uso cotidiano como lubricantes, en formulaciones de pinturas, cosméticos, en artículos de higiene personal, como soporte en pastillas, entre otros. Una de las características más importantes de este material, que está relacionada con un buen número de sus aplicaciones, es su anfifilia, la cual es responsable de que sea soluble en disolventes tanto polares (como N,N-dimetilformamida, agua, etanol) como apolares (como tolueno, cloroformo, diclorometano) o de que se use como surfactante polimérico.^{1, 2} Esta anfifilia es debida al balance de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de su estructura. En relación a la solubilidad en agua, la PVP pertenece a una exclusiva familia de polímeros neutros solubles en este medio y de gran interés biomédico, de la que podemos destacar el poli-etilenglicol (PEG), el poli-vinilalcohol (PVA) o la poli-hidroxipropil metacrilamida (PHPMA). Los dos primeros, PEG y PVA, son también dos conocidos surfactantes poliméricos.

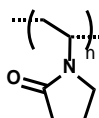


Figura I.1: Estructura de la unidad repetitiva de PVP.

Esta solubilidad en agua, así como su baja toxicidad y sus elevadas estabilidad química e inercia biológica hacen a la PVP un material muy atractivo en aplicaciones del ámbito de las ciencias de la vida que requieran la interacción con fluidos biológicos. De hecho, ya en la segunda guerra mundial se usó como expansor de plasma sanguíneo,³ y fue el polímero elegido para preparar el primer conjugado inyectable polímero-fármaco.⁴ Además, y relacionado con lo anteriormente descrito, PVP adsorbido o anclado en superficies resiste la adsorción no específica de proteínas.⁵⁻¹⁰ Entre otras aplicaciones de este polímero podemos destacar su uso como soporte de yodo molecular para la preparación de betadine®, un conocido desinfectante y antiséptico para el tratamiento de cortes superficiales en la piel. También ha sido un componente clásico de lentes de contacto^{11, 12} y es usado en alimentación como aditivo, estabilizante (E1201) y clarificante en bebidas, además de estar presente como soporte en cientos de pastillas suministradas por vía oral (está aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA)¹³). Tanto la PVP como su unidad estructural, N-vinil-2-pirrolidona (VP), forman parte del grupo de componentes biocompatibles como homo- y copolímeros de primera elección en el diseño de biomateriales.

2. Funcionalización de PVP

Como se mencionó anteriormente, PVP y PEG son polímeros que tienen propiedades muy similares: son no iónicos ni tóxicos, así como anfifílicos (son solubles en medios polares y no polares). Hay, sin embargo, una diferencia estructural muy importante y es que el PEG posee uno o dos grupos OH terminales, los cuales han sido usados ampliamente para preparar derivados de PEG de interés en diferentes campos, ya que la modificación de estos grupos es relativamente sencilla (Figura I.2). Así, esta química sobre PEG se ha usado para preparar por ejemplo conjugados con proteínas o fármacos con fines terapéuticos,¹⁴⁻¹⁸ catalizadores solubles en agua,¹⁹⁻²³ surfactantes,^{24, 25} así como derivados de especies catiónicas para su aplicación en terapia génica como vectores no virales²⁶⁻²⁹ (simulando el comportamiento de los vectores comerciales como poli-L-lisina (PLL) o poli-etilenimina (PEI)), intentando reducir el efecto tóxico de los mismos. Algunos productos PEGilados están ya en el mercado o en fases clínicas avanzadas.^{30, 31}

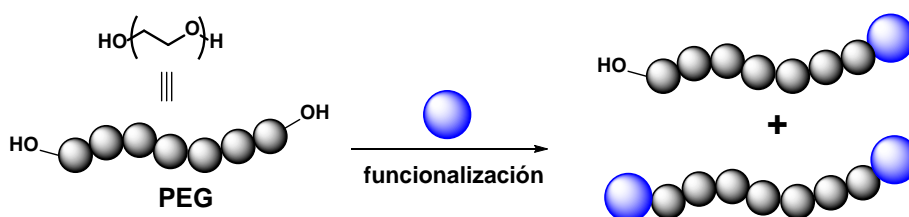


Figura I.2: Esquema de la modificación en el extremo de cadena del PEG.

A pesar de todo, el PEG también presenta algunas desventajas. Se ha descrito que algunos biomateriales funcionalizados con este polímero presentan pérdidas de propiedades debido a procesos de degradación oxidativa.³² Otra limitación es que sólo presenta una o dos funcionalidades posibles (una por cada extremo de cadena), lo que podría ser apropiado en algunos casos pero no ofrecería una polifuncionalidad. Esta polifuncionalidad sería apropiada en el caso de aplicaciones donde el soporte fuese limitado, intentando aprovechar al máximo cada unidad repetitiva del polímero, o para aumentar la efectividad y prestaciones del material usando lo mínimo posible. Un ejemplo sería la obtención de polímeros con catalizadores anclados en su estructura, donde la carga de las moléculas activas es esencial para su aplicabilidad.

Un polímero análogo que permite esta polifuncionalidad es la poli-hidroxipropil metacrilamida (PHPMA), mencionada antes como uno de los polímeros neutros solubles en agua (Figura I.3). Este polímero posee grupos hidroxilo laterales en cada una de las unidades repetitivas, a diferencia del PEG, que posee uno o dos OH en los extremos de cadena, por lo que PHPMA permite preparar sistemas con una cantidad muy superior a 2 moléculas activas por cadena. Además, ya que el grupo funcional derivatizable está situado en la unidad repetitiva y por tanto, en el monómero precursor, se pueden llevar a cabo diseños estructurales “bottom-up”, es decir, se puede derivatizar el monómero precursor y obtener el conjugado polimérico mediante una sencilla copolimerización radical con HPMa no modificado. Esta aproximación “bottom-up” es muy flexible y versátil: no sólo permite controlar la carga de compuesto activo mediante un simple ajuste composicional en el medio de

reacción, sino que también permite obtener sistemas multifuncionales si se añaden más de un tipo de monómero conjugado. Esta estrategia se ha usado con éxito para preparar diferentes estructuras derivadas de PHPMA conjugadas con anticancerígenos (como la doxorubicina).³³ Algunos de estos sistemas están en fase de ensayos clínicos.³⁴ En la Figura I.3 se muestra un ejemplo multifuncional en el que se ha anclado galactosa como grupo de vectorización hepática, además de la doxorubicina.³⁵

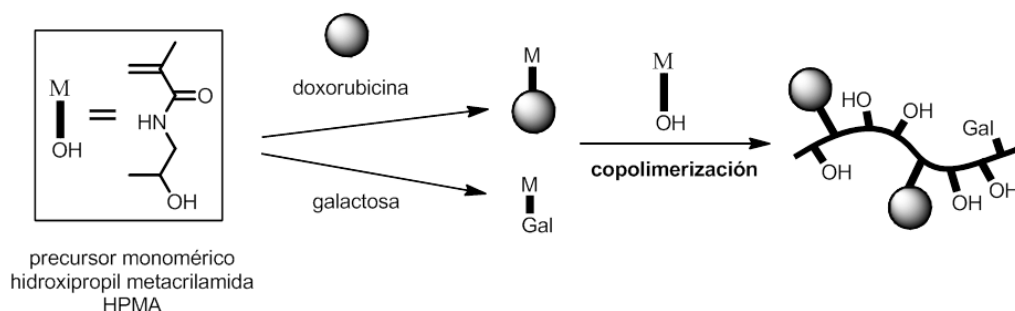


Figura I.3. Esquema de la aproximación "bottom-up" para preparar sistemas multifuncionales basada en la modificación de monómeros y su copolimerización con el precursor no modificado.

A pesar de los exitosos ejemplos anteriores de conjugados anticancerígenos, PHPMA es ampliamente superado por PEG en rango de propiedades (como su solubilidad en diferentes medios) y aplicaciones. PVP es comparable a PEG en este aspecto, y comparte con PHPMA la facilidad de su preparación mediante polimerización radical convencional a partir del precursor VP (por ejemplo en agua). Sin embargo, PVP no posee grupos funcionales activos en su estructura. Por ello, existe un gran interés en funcionalizar PVP (y VP). Los extremos de cadena sí pueden ser funcionalizados durante el proceso de polimerización, usando por ejemplo agentes de transferencia funcionales o terminadores específicos en polimerización controlada o viva.³⁶⁻³⁸ De esta manera, se obtendría la posibilidad de funcionalización en los extremos de cadena, de forma similar al caso concreto del PEG. Pero como ya comentamos, la funcionalización lateral ofrece poli- y multifuncionalidad.

Con el fin de obtener PVP funcionalizada en la cadena lateral se pueden distinguir tres estrategias: 1- modificación química del homopolímero de VP, 2- copolimerización de VP con otros monómeros de diferente naturaleza portadores del grupo funcional, y 3- funcionalización del monómero VP y posterior homo- o copolimerización con el monómero nativo sin modificar. Estas dos últimas rutas comparadas con la primera de modificación del polímero nativo se pueden considerar rutas "bottom-up" de preparación de polímeros funcionalizados a partir de los precursores adecuados, similares a la mencionada anteriormente para la obtención de conjugados de PHPMA.

En relación a la estrategia 1, otros grupos de investigación han intentado funcionalizar PVP mediante la modificación directa del polímero (Figura I.4). PVP es un polímero que contiene grupos amida cíclica que se pueden abrir por ejemplo por hidrólisis, método mediante el cual se obtienen copolímeros multifuncionales de cadena lateral en los que, sin embargo, no se mantiene la integridad

de los anillos,^{39, 40} perdiendo así su estructura. Se ha descrito también la bromación de la PVP a altas temperaturas, que conduce a un polímero con una modificación bastante poco específica, así como la epoxidación.^{41, 42}

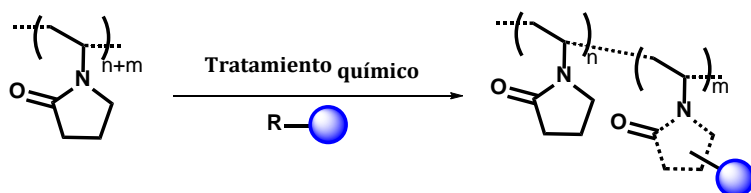


Figura I.4: Ruta 1 de funcionalización de PVP mediante un tratamiento químico.

La desventaja general de la modificación de polímeros es la imposibilidad de purificar los productos obtenidos. De hecho, resulta imposible eliminar tanto las unidades que no hayan reaccionado como aquellas que hayan conducido a reacciones secundarias no deseadas ya que todas ellas están ancladas covalentemente a las cadenas macromoleculares. Se obtendrían pues cadenas de PVP modificadas sin ningún control, tanto en grupos funcionales (naturaleza y número) como estructural.

La mayoría de trabajos descritos sobre la funcionalización lateral de la PVP se ha realizado mayoritariamente siguiendo la ruta 2, mediante copolimerización radical de VP con otros monómeros portadores de la funcionalidad (Figura I.5). En este caso, la funcionalización no la portan las unidades de VP sino comonómeros de diferente naturaleza, como el anhídrido maléico⁴³⁻⁴⁷ y sus derivados, ácido acrílico,⁴⁸ aminoalquilacrilamidas,⁴⁹ aminoalquil e hidroxialquilolefinas,⁵⁰ entre otros.

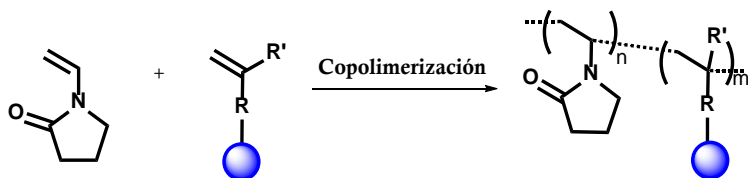


Figura I.5: Ruta 2 de funcionalización de PVP mediante copolimerización de VP con monómeros "heterólogos" (aproximación "bottom-up").

Estas copolimerizaciones con otros componentes que no sean VP (que podemos denominar "heterólogos" hacia VP) no deberían considerarse funcionalizaciones auténticas de PVP porque conducen a esqueletos macromoleculares que no sólo contienen unidades de VP. Además, este tipo de procesos de copolimerización tiene la desventaja asociada a las reactividades diferenciales de los comonómeros que, en algunos casos, pueden resultar muy relevantes y pueden conducir a una heterogeneidad composicional extrema del polímero resultante.⁵¹ En realidad, VP es un monómero peculiar en copolimerización radical ya que se le incluye en un grupo especial de "monómeros poco activados" y, en copolimerización con otros monómeros como los acrílicos (la familia comercial de monómeros más numerosa, que incluye metacrilamidas, acrilatos y acrilamidas), cualquiera de los

macrorradicales en crecimiento es mucho más reactivo hacia la unidad acrílica que hacia la de VP. El resultado es que, en un reactor discontinuo a altas conversiones, el “acumulado” de cadenas de copolímeros será muy heterogéneo y estará formado por cadenas ricas en la unidad más reactiva (en este ejemplo, el acrílico) formadas al principio de la reacción, y cadenas ricas en VP formadas al final. Este aspecto se discutirá con más detalle más adelante.

Las limitaciones mencionadas asociadas al uso de comonómeros “heterólogos” a la VP como los acrílicos (heterogeneidad composicional y pérdida del esqueleto de la PVP) hacen que la mejor alternativa para la preparación de derivados de PVP multifuncionales de cadena lateral sea la ruta “*bottom-up*” homóloga, basada en la modificación del monómero de VP seguida por homo- o copolimerización con VP no modificada, es decir, la ruta 3 mencionada al principio (Figura I.6).

Esta ruta proporciona un control versátil del número de grupos funcionales y de la composición, además de permitir una distribución al azar de grupos funcionales manteniendo la integridad de la cadena. De este modo, se pueden obtener cadenas principales de PVP puro manteniendo la integridad de los anillos de γ -lactama. Además, las reactividades de la VP original y VP modificada serían similares, dada la homología del doble enlace, y se podrían evitar así las heterogeneidades en copolimerización provocadas por reactividades diferenciales mencionadas anteriormente.

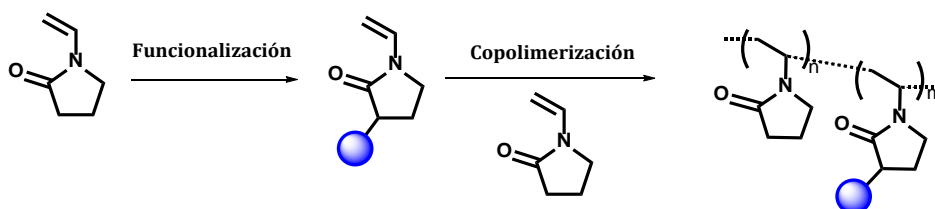


Figura I.6: Ruta 3 de funcionalización de PVP: aproximación “*bottom-up*” homóloga de funcionalización de PVP mediante derivatización de VP y posterior copolimerización con VP nativa.

Esta estrategia ha sido utilizada para preparar PVPs con diferentes grupos funcionales, tales como ácidos,^{52, 53} ésteres y amidas,⁵⁴ alcoholes y tioles,⁵⁵⁻⁵⁷ grupos alquilo,^{56, 58, 59} sulfonatos,⁶⁰ ciclodextrinas,⁶¹ e incluso moléculas de interés biológico, como el colesterol.⁶² Sin embargo, hasta el momento no se conocen derivados de VP portadores de grupos amina alifática. En el grupo de investigación donde se ha realizado esta tesis doctoral, Tardajos y col. reportaron la preparación de VP y PVP funcionalizados con aminas aromáticas,⁶³ aunque no de aminas alifáticas, siendo estos grupos de gran interés como se detalla en el apartado siguiente. El trabajo elaborado en esta tesis se centra en la síntesis de monómeros basados en VP con grupos amina alifática, así como sus correspondientes polímeros obtenidos siguiendo la ruta 3, los cuales son una clase de macromoléculas inéditas en la literatura y que pueden tener aplicaciones en campos como la catálisis o la biomedicina.

3. Las aminas como grupos funcionales

Las aminas son moléculas orgánicas derivadas del amoniaco, cuya naturaleza y propiedades dependen de la sustitución de los diferentes hidrógenos del amoniaco, dando múltiples compuestos nitrogenados que se clasifican en aminas primarias, secundarias o terciarias al sustituir uno, dos o los tres hidrógenos del amoniaco, respectivamente. Estas moléculas tienen un carácter muy polar, el cual disminuye al aumentar el grado de sustitución del nitrógeno. De igual forma, la tendencia a formar enlaces de hidrógeno con otras moléculas disminuye al aumentar esta sustitución. Además, son especies nucleófilas debido a que el nitrógeno tiene un par de electrones libre, aportándole una tendencia a reaccionar con grupos electrófilos o con deficiencia de carga, así como con elementos metálicos, los cuales disponen de orbitales electrónicos vacíos en su estructura donde poder albergar ese par de electrones (enlace de coordinación). Además de aminas primarias, secundarias y terciarias, existe un cuarto grupo: las aminas cuaternarias, que se obtienen por ejemplo de la reacción de una amina terciaria con un grupo electrofílico, donde el nitrógeno cede su par de electrones libre para formar un enlace covalente, quedando un compuesto nitrogenado con carga positiva (derivado de amonio).

Polímeros y monómeros precursores portadores de alguno de los cuatro tipos de aminas mencionados en el párrafo anterior son de gran interés en el ámbito tecnológico y biomédico. Este interés se puede razonar desde dos puntos de vista. Por una parte, las aminas tienen interés *per se*; así, y enlazando con los trabajos abordados en la tesis, algunas especies de amina como la L-prolina se consideran integrantes estructurales fundamentales en la funcionalidad de ciertos organocatalizadores, simulando a ciertas enzimas naturales. También tiene gran interés su carga positiva, permanente en el caso de las aminas cuaternarias. Estas aminas cuaternarias ancladas a estructuras poliméricas tienen gran importancia en el campo (bio)tecnológico,^{64, 65} en estructuras de tensioactivos,⁶⁶ antimicrobianos,^{67, 68} agentes de transferencia de fase,⁶⁹ entre otros. Los otros tres tipos de amina (primaria, secundaria y terciaria) son estructuras cationizables. Se ionizan por debajo de su pK_a , por lo que en medios más ácidos son estructuras catiónicas y en medios más básicos (por encima del pK_a) son grupos neutros. Ancladas a sistemas poliméricos, esta ionizabilidad dependiente del pH se ha usado por ejemplo para preparar sistemas sensibles al pH (como sistemas poliméricos lineales con capacidad de gelación⁷⁰ o hidrogeles que se hinchan o colapsan con variaciones de pH^{71, 72}). Además, la gran mayoría de vectores poliméricos propuestos para complejar y transportar ácidos nucleicos son macromoléculas portadoras de alguno de estos tres tipos de amina (como la polietilenimina (PEI)⁷³ o la poli-L-lisina (PLL)⁷⁴). En esta tesis se han preparado PVPs funcionalizadas con aminas primarias, secundarias y terciarias (con diferente contenido de las mismas) y han sido evaluadas *in vitro* como vectores de ADN. Se han preparado además sistemas poliméricos portadores de L-prolina, los cuales han sido evaluados como catalizadores de reacciones aldólicas asimétricas. VPs con grupos amonio cuaternario han sido usados para funcionalizar la interfaz o la superficie de sistemas poliméricos dispersos, obteniendo así partículas sólidas con carga positiva en su superficie.

Por otra parte, las aminas primarias y las secundarias son grupos muy reactivos, y son sin duda agentes nucleófilos de primera elección para llevar a cabo acoplamientos como el que tiene lugar con ácidos y ácidos activados. En el contexto de esta tesis, es de interés su uso en reacciones de adición de Michael-1,4 a carbonilos α,β -insaturados. Si el carbonilo α,β -insaturado es un éster, se genera un β -aminoéster, que es grupo activado para la hidrólisis, una característica gratamente provechosa en aplicaciones biomédicas y tecnológicas para la preparación de macromoléculas con grupo lateral degradable.^{77, 78} Esta química ha sido usada en este trabajo para preparar conjugados solubles e hidrolizables de PVP con fármacos hidroxílicos, y para la obtención de redes bi-componentes poliméricas hidrolizables.

En el Capítulo 1 se desarrolla la puesta a punto y optimización de métodos sintéticos para funcionalizar el monómero de VP con grupos amina de diversa naturaleza. Estos compuestos van a permitir que, en un segundo paso, se obtengan copolímeros y homopolímeros de PVP con diferentes aminas o derivados de aminas como grupos laterales activos unidos covalentemente a las cadenas, controlando el grado de funcionalización mediante la mencionada estrategia “*bottom-up*”. En el resto de capítulos se detallan sus posibles aplicaciones, como liberación controlada de fármacos, agentes no virales de transfección y catálisis en síntesis orgánica, entre otras.

4. Polimerización radical convencional de VP

Como se menciona en el apartado 2, el monómero de VP pertenece al grupo de monómeros “poco activados” debido a su baja velocidad de reacción en polimerización radical. Otros monómeros como N-vinilcaprolactona (NVC) y acetato de vinilo (VA) también forman parte de este grupo. Esta característica viene dada por la naturaleza del grupo vinílico, donde el heteroátomo (ya sea nitrógeno u oxígeno) juega un papel fundamental en la estabilidad del radical. Además, la densidad electrónica del enlace C=C es mayor que en monómeros como los derivados del estireno, acrilatos y metacrilatos, haciéndolo menos susceptible a la reacción radicalaria. De acuerdo al esquema empírico Q,e de Alfrey y Price⁷⁵ (donde Q y e son parámetros relacionados con la reactividad y la polaridad respectivamente), muy utilizado históricamente para predecir y discutir copolimerizaciones binarias, el bajo valor de Q de VP⁷⁶ hace que, en la mencionada copolimerización con otros monómeros “más activados” como los acrilatos, cualquiera de los macrorradicales en crecimiento sea mucho más reactivo hacia la unidad acrílica (que tiene un alto valor de Q) que hacia la VP. El resultado es, como se ha mencionado antes, una alta heterogeneidad composicional en reactores discontinuos, heterogeneidad que es un claro inconveniente si el objetivo es preparar cadenas con estructura bien definida de PVP funcionalizada. Por ello, se han sintetizado monómeros de VPs con diferentes derivados de amina, ya que su copolimerización con VP no modificada permite obtener (siguiendo la estrategia 3) cadenas funcionalizadas de VP con una alta homogeneidad composicional y una distribución al azar de estos grupos funcionales.

Una prueba clara de la heterogeneidad mencionada antes en la copolimerización radical entre VP y metacrilatos se presenta en la Figura I.7,⁷⁷ donde los electroferogramas muestran el análisis por

MEKC (cromatografía electrocinética micelar) de acumulados a media y alta conversión en la copolimerización equimolar de VP y metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA).

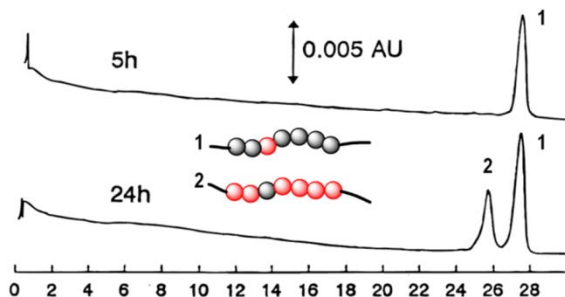


Figura I.7: Electroferogramas de dos reacciones de copolimerización VP/HEMA equimolares detenidas tras 5 y 24 horas de reacción. Las unidades de VP y metacrílicas están representadas por esferas rojas y negras respectivamente.

Básicamente, MEKC detectó dos especies bien diferenciadas con diferente hidrofobicidad, que se asignaron a cadenas ricas en HEMA y en VP (picos 1 y 2 respectivamente)⁷⁷. Un análisis de la reacción a baja conversión (5 horas de reacción, electroferograma superior) mostró un solo pico, el más hidrofóbico, asignado a cadenas ricas en el monómero HEMA más reactivo, y que son las primeras que se forman.

Por tanto, en la copolimerización de VP con metacrilatos, en una sola reacción se forman dos tipos de especies. Este hecho puede ser visto como una oportunidad en química de polímeros de cara a preparar en un sencillo y único paso estructuras “auto-ordenadas” de dos componentes mediante copolimerización de VP con diferentes metacrilatos. Así, Aranaz y col. mostraron en un primer ejemplo que la copolimerización de VP y metacrilato de metilo (MMA) en metanol rinde en una sola etapa cadenas ricas en MMA y cadenas ricas en VP, que fueron capaces de compartimentarse en el propio medio alcohólico debido al fenómeno UCST (*Upper Critical Solution Temperature*) del PMMA, y en agua, donde se obtuvieron microesferas ricas en MMA estabilizadas por cadenas ricas en VP (recordemos que es un surfactante polimérico), en un proceso que podemos denominar “autoestabilizante”.^{78, 79} En un segundo ejemplo, Tardajos y col. mostraron que la copolimerización de redes de VP y metacrilato de butilo en presencia de entrecruzantes asimétricos portadores de funcionalidad metacrílica y N-vinilamida (“homólogas” a los dos monómeros) dio lugar a pseudo co-redes anfífilas capaces de segregarse en fases.⁸⁰

Con estos antecedentes, en esta tesis se ha incorporado la VP derivatizada con el grupo catiónico amina cuaternaria (también inédito en la literatura) para preparar sistemas dispersos similares a los descritos por Aranaz y col., pero con carga positiva localizada, tal y como se ha mencionado antes. Además, se ha hecho uso de la química de adición de Michael para obtener un entrecruzante asimétrico hidrolizable que ha sido evaluado en la formación de redes anfífilas de dos componentes.

Además, se ha hecho uso de la reactividad diferencial de la VP y monómeros activados para

preparar copolímeros de VP modificada con N-fenilmaleimida (PMI) con una alta tendencia a la alternancia (Figura I.8), tendencia basada en la dificultad para homopolimerizar de monómeros acrílicos 1,2-disustituídos como los maleatos o la mencionada maleimida. Debido a la baja activación de VP, un macrorradical acabado en VP es mucho más reactivo hacia el otro comonómero, y el nuevo macrorradical formado, acabado en este caso en PMI, sólo puede reaccionar con el monómero de VP debido al impedimento estérico que ofrece la PMI. En consecuencia, se forman secuencias alternantes casi puras hasta que se consume uno de los dos monómeros. Este hecho ha sido usado ampliamente para preparar, dentro de la estrategia 2 descrita en el apartado 2, copolímeros de VP con maleatos con una distribución alternante.⁸¹⁻⁸³

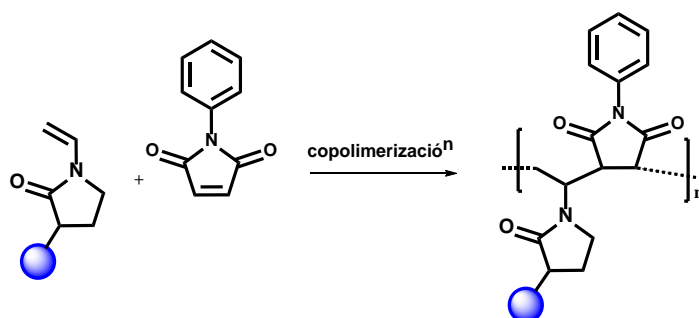


Figura I.8: Copolimerización alternante entre VP funcionalizada y PMI.

5. Hipótesis y objetivos de la tesis

Este trabajo parte de la hipótesis de que la preparación de VP con diferentes derivados aminados, no descrita nunca antes en la literatura, puede permitir preparar nuevos materiales con propiedades singulares de gran interés en diferentes campos. Estos materiales son, bien derivados de PVP, o bien sistemas con orden estructural derivados de VP y monómeros activados como metacrilatos o monómeros acrílicos 1,2-disustituídos, en este caso, la PMI.

Los objetivos concretos de esta tesis son:

1. Diseño, síntesis y caracterización de monómeros derivados de VP con diferentes aminas alifáticas primarias, secundarias, terciarias o cuaternarias, entre las que se incluye la estructura de la L-prolina como amina secundaria quiral. Estudio de su polimerizabilidad.
2. Evaluación de la posible aplicación de los polímeros de PVP aminados como vectores no virales en terapia génica, determinando su capacidad de complejar ADN, así como su citotoxicidad y eficiencia de transfección *in vitro*.
3. Preparación y evaluación catalítica de diferentes polímeros lineales a partir del monómero de VP funcionalizado con L-prolina que puedan ser de interés en medios orgánicos y/o acuosos. Se hará uso de la reactividad diferencial de VP y maleimidas para obtener sistemas con tendencia a la alternancia activados hidrofólicamente que permitan la catálisis enantioselectiva en agua.

4. Uso de la reactividad de las VPs con aminas primarias en adición de Michael sobre acrilatos para 1- preparar conjugados hidrolizables de PVP con fármacos hidroxilados mediante una ruta “bottom-up”, y 2- preparar entrecruzantes asimétricos degradables.
5. Hacer uso de la reactividad diferencial de VP y metacrilatos para obtener sistemas dispersos (emulsiones alcohólicas o suspensiones acuosas) con carga positiva localizada en la interfaz o en la superficie respectivamente mediante la introducción de una pequeña cantidad de VP derivatizada con amina cuaternaria.
6. Hacer uso de la reactividad diferencial de VP y metacrilatos para preparar en un solo paso redes anfífilas segregadas con uniones entre cadenas hidrolizables haciendo uso del entrecruzante asimétrico degradable. Estudio de su comportamiento en medios acuosos.

6. Bibliografía

1. Z. Chen, Y. Tang, L. Zhang and L. Luo, *Electrochimica Acta*, 2006, **51**, 5870-5875.
2. Y. Chen, Y. Zhang and S. Fu, *Materials Letters*, 2007, **61**, 701-705.
3. H. A. Ravin, A. M. Seligman and J. Fine, *New England Journal of Medicine*, 1952, **247**, 921-929.
4. H. Jatzkewitz, *Z. Naturforsch*, 1955, **10**, 27-31.
5. S. Robinson and P. A. Williams, *Langmuir*, 2002, **18**, 8743-8748.
6. M. Hayama, K.-i. Yamamoto, F. Kohori and K. Sakai, *Journal of membrane science*, 2004, **234**, 41-49.
7. Z. Wu, H. Chen, X. Liu, Y. Zhang, D. Li and H. Huang, *Langmuir*, 2009, **25**, 2900-2906.
8. M. Hayama, K.-i. Yamamoto, F. Kohori, T. Uesaka, Y. Ueno, H. Sugaya, I. Itagaki and K. Sakai, *Biomaterials*, 2004, **25**, 1019-1028.
9. M. K. Ko, J. J. Pellegrino, R. Nassimbene and P. Marko, *Journal of membrane science*, 1993, **76**, 101-120.
10. M. Matsuda, K.-i. Yamamoto, T. Yakushiji, M. Fukuda, T. Miyasaka and K. Sakai, *Journal of Membrane Science*, 2008, **310**, 219-228.
11. U.S. Patent No 3,888,782, 10 Jun. 1975.
12. F. Yanez, A. Concheiro and C. Alvarez-Lorenzo, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, **69**, 1094-1103.
13. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=173.55>, Last Update 08/21/2015.

14. C. Delgado, G. E. Francis & D. Fisher (1994). U.S. Patent No. 5,349,052. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
15. A. Kozlowski and J. M. Harris, *Journal of Controlled Release*, 2001, **72**, 217-224.
16. M. Roberts, M. Bentley and J. Harris, *Advanced drug delivery reviews*, 2012, **64**, 116-127.
17. F. M. Veronese and G. Pasut, *Drug discovery today*, 2005, **10**, 1451-1458.
18. K. Zhu, L. Xiangzhou and Y. Shilin, *Journal of applied polymer science*, 1990, **39**, 1-9.
19. H. Han and K. D. Janda, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, **118**, 7632-7633.
20. M. Benaglia, M. Cinquini, F. Cozzi, A. Puglisi and G. Celentano, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2002, **344**, 533-542.
21. Q.-H. Fan, G.-J. Deng, X.-M. Chen, W.-C. Xie, D.-Z. Jiang, D.-S. Liu and A. S. Chan, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2000, **159**, 37-43.
22. Q.-H. Fan, G.-J. Deng, C.-C. Lin and A. S. Chan, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**, 1241-1247.
23. J. Lu and P. H. Toy, *Chemical reviews*, 2009, **109**, 815-838.
24. S. Beugin-Deroo, M. Ollivon and S. Lesieur, *Journal of colloid and interface science*, 1998, **202**, 324-333.
25. M. Grøtli, J. Rademan, T. Groth, W. D. Lubell, L. P. Miranda and M. Meldal, *Journal of combinatorial chemistry*, 2001, **3**, 28-33.
26. M. G. Banaszczyk, C. P. Lollo, D. Y. Kwok, A. T. Phillips, A. Amini, D. P. Wu, P. M. Mullen, C. C. Coffins, S. W. Brostoff and D. J. Carlo, *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, 1999, **36**, 1061-1084.
27. Y. Kakizawa, A. Harada and K. Kataoka, *Biomacromolecules*, 2001, **2**, 491-497.
28. M. Ogris, S. Brunner, S. Schüller, R. Kircheis and E. Wagner, *Gene therapy*, 1999, **6**, 595-605.
29. H. Petersen, P. M. Fechner, A. L. Martin, K. Kunath, S. Stolnik, C. J. Roberts, D. Fischer, M. C. Davies and T. Kissel, *Bioconjugate chemistry*, 2002, **13**, 845-854.
30. M. W. Fried, M. L. Shiffman, K. R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F. L. Gonçalves Jr, D. Häussinger, M. Diago, G. Carosi and D. Dhumeaux, *New England Journal of Medicine*, 2002, **347**, 975-982.
31. J. G. McHutchison, E. J. Lawitz, M. L. Shiffman, A. J. Muir, G. W. Galler, J. McCone, L. M. Nyberg, W. M. Lee, R. H. Ghalib and E. R. Schiff, *New England Journal of Medicine*, 2009, **361**, 580-593.
32. E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama and G. M. Whitesides, *Langmuir*, 2001, **17**, 5605-5620.

33. A. K. Mohanty, F. Dilnawaz, G. P. Mohanta and S. K. Sahoo, in *Targeted Drug Delivery: Concepts and Design*, Springer, 2015, pp. 389-407.
34. J. Kopeček and P. Kopečková, *Advanced drug delivery reviews*, 2010, **62**, 122-149.
35. R. Duncan, *Advanced drug delivery reviews*, 2009, **61**, 1131-1148.
36. A. N. Zelikin, G. K. Such, A. Postma and F. Caruso, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 2950-2953.
37. G. Pound, J. M. McKenzie, R. F. Lange and B. Klumperman, *Chemical Communications*, 2008, 3193-3195.
38. C. Baldoli, C. Oldani, S. Maiorana, P. Ferruti, E. Ranucci, M. Bencini and A. Contini, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2008, **46**, 1683-1698.
39. A. J. M. D'Souza, R. L. Schowen and E. M. Topp, *Journal of controlled release*, 2004, **94**, 91-100.
40. B.-U. von Specht and W. Brendel, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 1977, **484**, 109-114.
41. W. Albrecht, J. Schauer, T. Weigel, K. Richau, T. Groth and A. Lendlein, *Journal of membrane science*, 2007, **291**, 10-18.
42. R. Devarajan, V. Arunachalam, M. Kumaraswamy, I. Tajuddin and T. Joghee, *Journal of Applied Polymer Science*, 1992, **44**, 1473-1475.
43. N. A. Samoilova, M. A. Krayukhina, S. P. Novikova, T. A. Babushkina, I. O. Volkov, L. I. Komarova, L. I. Moukhametova, R. B. Aisina, E. A. Obratsova and I. V. Yaminsky, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, **82**, 589-598.
44. G. Qian, J. Ma, J. Zhou and B. He, *Reactive and functional polymers*, 1997, **32**, 117-121.
45. M. Móra, J. Pató and F. Tüdös, *Die Makromolekulare Chemie*, 1989, **190**, 1967-1974.
46. A. Kalnay, I. Palyi, B. Vincze, R. Mihalik, I. Mezo, J. Pato, J. Seprodi, S. Lovas and R. Murphy, *Cell Proliferation*, 2000, **33**, 275-285.
47. A. A. Babakhin, L. M. DuBuske, A. W. Wheeler, B. Stockinger, H. Nolte, S. M. Andreev, I. S. Gushchin, R. M. Khaitov and R. V. Petrov, *Ocean Side Publications, Inc*, 1995, **16**, 261-268.
48. F. Liu, S. C. Song, D. Mix, M. Baudyš and S. W. Kim, *Bioconjugate chemistry*, 1997, **8**, 664-672.
49. J. S. Shih & J. C. Chuang. (1993). U.S. Patent No. 5,206,322. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
50. E. S. Barabas, M. M. Fein & A. Merijan. (1971). U.S. Patent No. 3,563,968. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

51. M. Sánchez-Chaves, G. Martínez, E. López Madruga and C. Fernández-Monreal, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2002, **40**, 1192-1199.
52. W. He, K. E. Gonsalves, J. H. Pickett and C. Halberstadt, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 75-79.
53. J. B. Kim, M. H. Jung & K. H. Chang. (1998). U.S. Patent No. 5,750,680. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
54. B. V. Popp, D. H. Miles, J. A. Smith, I. M. Fong, M. Pasquali and Z. T. Ball, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2015, **53**, 337-343.
55. J. U. Engström and B. Helgee, *Journal of combinatorial chemistry*, 2006, **8**, 355-360.
56. J. U. Engström, B. Helgee, S. D. Sung and D. E. Bergbreiter, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2006, **207**, 1062-1069.
57. M. Pérez Perrino, R. Navarro, M. Gómez Tardajos, A. Gallardo and H. Reinecke, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2009, **210**, 1973-1978.
58. L. White, S. Jönson, C. Hoyle and L. J. Mathias, *Polymer*, 1999, **40**, 6597-6605.
59. G.-T. Chen, C.-H. Wang, J.-G. Zhang, Y. Wang, R. Zhang, F.-S. Du, N. Yan, Y. Kou and Z.-C. Li, *Macromolecules*, 2010, **43**, 9972-9981.
60. M. G. Tardajos, L. García-Fernández, H. Reinecke, M. R. Aguilar, A. Gallardo and J. S. Román, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2012, **27**, 453-466.
61. T. Trellenkamp and H. Ritter, *Macromolecules*, 2010, **43**, 5538-5543.
62. I. Cho and S. W. Jeong, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 1995, **196**, 869-875.
63. M. Gómez-Tardajos, J. P. Pino-Pinto, C. Díaz-Soto, M. E. Flores, A. Gallardo, C. Elvira, H. Reinecke, H. Nishide and I. Moreno-Villoslada, *Dyes and Pigments*, 2013, **99**, 759-770.
64. Q. Liu, F. Lin and R. A. Hartwick, *Journal of chromatographic science*, 1997, **35**, 126-130.
65. K. Liu, J. Zhang, G. Yang, C. Wang and J.-J. Zhu, *Electrochemistry Communications*, 2010, **12**, 402-405.
66. P. Anton and A. Laschewsky, *Colloid and Polymer Science*, 1994, **272**, 1118-1128.
67. Z. Jia and W. Xu, *Carbohydrate research*, 2001, **333**, 1-6.
68. P. Thebault, E. T. de Givenchy, R. Levy, Y. Vandenberghe, F. Guittard and S. Géribaldi, *European journal of medicinal chemistry*, 2009, **44**, 717-724.
69. H. Molinari, F. Montanari, S. Quici and P. Tundo, *Journal of the American Chemical Society*, 1979, **101**, 3920-3927.
70. D. M. Henn, R. A. Wright, J. W. Woodcock, B. Hu and B. Zhao, *Langmuir*, 2014, **30**, 2541-2550.

71. B. Zhao and J. S. Moore, *Langmuir*, 2001, **17**, 4758-4763.
72. N. González, C. Elvira and J. S. Román, *Macromolecules*, 2005, **38**, 9298-9303.
73. W. Godbey, K. K. Wu and A. G. Mikos, *Journal of Controlled Release*, 1999, **60**, 149-160.
74. S. Hong, P. R. Leroueil, E. K. Janus, J. L. Peters, M.-M. Kober, M. T. Islam, B. G. Orr, J. R. Baker and M. M. Banaszak Holl, *Bioconjugate chemistry*, 2006, **17**, 728-734.
75. T. Alfrey and C. C. Price, *Journal of Polymer Science*, 1947, **2**, 101-106.
76. J. Brandrup, E. Immergut and E. A. Grulke, *Polymer Handbook*, 2003.
77. A. Gallardo, A. R. Lemus, J. San Román, A. Cifuentes and J. C. Díez-Masa, *Macromolecules*, 1999, **32**, 610-617.
78. I. Aranaz, H. Reinecke, C. Elvira and A. Gallardo, *Polymer*, 2011, **52**, 2991-2997.
79. M. G. Tardajos, I. Aranaz, F. Sayar, C. Elvira, H. Reinecke, E. Piskin and A. Gallardo, *Langmuir*, 2012, **28**, 5555-5561.
80. M. G. Tardajos, I. Aranaz, M. n. Pérez, D. López, H. Reinecke, C. Elvira and A. Gallardo, *Macromolecules*, 2013, **46**, 5018-5025.
81. Y. Yamamoto, Y. Tsutsumi, Y. Yoshioka, H. Kamada, K. Sato-Kamada, T. Okamoto, Y. Mukai, H. Shibata, S. Nakagawa and T. Mayumi, *Journal of controlled release*, 2004, **95**, 229-237.
82. Y. Abe, H. Shibata, H. Kamada, S.-I. Tsunoda, Y. Tsutsumi and S. Nakagawa, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 2006, **6**, 251-258.
83. S. Kim, S. W. Kim and Y. H. Bae, *Biomaterials*, 2005, **26**, 3597-3606.

CAPÍTULO 1
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
MONÓMEROS AMINADOS OBTENIDOS A
PARTIR DE N-VINIL-2-PIRROLIDONA

CAPÍTULO 1: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MONÓMEROS AMINADOS OBTENIDOS A PARTIR DE N-VINIL-2-PIRROLIDONA

1. Introducción

Como se ha descrito en la Introducción General de esta tesis, la modificación del monómero N-vinil-2-pirrolidona (VP) seguida por homo- o copolimerización con VP no modificada parece ser la mejor alternativa para la preparación de derivados de PVP poli- y multifuncionales de cadena lateral. Esta ruta de síntesis de PVP funcionalizada permite un control versátil del número y tipo de grupos funcionales además de ofrecer una distribución homogénea de las funcionalidades. De este modo se pueden obtener cadenas principales con esqueleto de PVP (manteniendo la integridad de los anillos de la pirrolidona).

La síntesis de PVP funcionalizada por esta vía requiere el esfuerzo sintético de obtener el monómero VP funcionalizado. Como amida cíclica, la VP contiene un enlace carbono-hidrógeno fuertemente polarizado en posición α del grupo carbonilo (posición 3 en el anillo). Con bases fuertes se puede abstraer este hidrógeno, formando el anión enolato de la carboxamida. Este compuesto intermedio se puede emplear para atacar compuestos electrófilos dado su carácter nucleófilo. La modificación de la VP haciendo reaccionar el enolato de la carboxiamida permite preservar el anillo de la lactama y el doble enlace polimerizable.

Esta funcionalización en posición 3 se llevó a cabo por primera vez por White y colaboradores¹ por ataque nucleófilo a alquilhaluros para conectar cadenas hidrocarbonadas puras a la VP y para sintetizar entrecruzantes portadores de dos unidades de VP unidas por una cadena hidrocarbonada. Estos autores usaron diisopropilamiduro de litio (LDA) como base fuerte y baja temperatura (-78 °C). Otros grupos usaron estas condiciones para preparar diferentes VPs funcionalizadas en posición 3, usando grupos protectores para obtener, tras la desprotección, VPs con grupos OH o COOH.²⁻⁶ Como alternativa a estas rutas de dos etapas, el grupo de trabajo en el que se ha realizado esta tesis describió una ruta de obtención de VPs funcionalizadas en posición 3 a partir de precursores cíclicos en una sola etapa. De esta manera obtuvieron VPs portadoras de grupos hidroxilo, sulfonato o amina aromática, las cuales permitieron obtener PVPs funcionalizadas de interés en diferentes campos.⁷⁻¹⁰ Es de destacar que este grupo usó esta química para obtener entrecruzantes simétricos y asimétricos derivados de VP (y en su caso de metacrilatos), que han mostrado un gran potencial en la obtención simple de materiales de dos componentes pseudoordenados.^{11, 12}

Además de las estructuras mencionadas, otros grupos han descrito la síntesis de VPs portadoras de entidades más complejas como la β -ciclodextrina¹³ o el colesterol.¹⁴ Sin embargo, y tal y como se comentó en la Introducción General, no se han descrito VPs portadoras de aminas alifáticas a pesar de su gran interés. En este trabajo de tesis se ha llevado a cabo esta labor sintética por primera vez, y se han preparado diferentes VPs y PVPs portadores de diferentes aminas o derivados de aminas como sustituyentes laterales.

En este capítulo se describen las síntesis de todos los precursores, es decir, de los diferentes tipos de monómeros funcionalizados con aminas usados en los siguientes capítulos para preparar y evaluar diferentes polímeros de interés. En concreto, se ha preparado VP portadora de amina primaria (protegida y desprotegida), de aminas cíclicas derivadas de pirrolidina, piperidina y piperazina (en este último caso la amina secundaria está protegida), de L-prolina y de sal de amina cuaternaria. El monómero portador de amina primaria se ha usado para obtener un conjugado hidrolizable de VP con 2-fenoxietanol (2-PE) como fármaco modelo portador de grupos hidroxilo. Además, y como continuación del trabajo basado en entrecruzantes derivados de VP, se ha sintetizado un nuevo entrecruzante asimétrico portador de VP y metacrilato en el que el espaciador es hidrolizable (Figura 1.1).

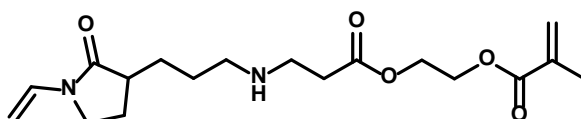


Figura 1.1: Estructura del entrecruzante asimétrico VP-Metacrilato degradable (MVhid).

Los monómeros descritos en este trabajo se obtuvieron a partir de dos precursores principales (derivados de alquilo): un derivado bromado (inédito en la literatura) y otro portador de un grupo alquino terminal (previamente descrito por el grupo de Ritter¹³). Sobre el derivado bromado (VPBr) se realizaron reacciones de sustitución nucleófila, mientras que el derivado con un alquino terminal (VPgyl) se empleó para reacciones de cicloadición 1,3-dipolar con azidas, una química más conocida como química “click”. En los últimos años, la química “click” se ha empleado exponencialmente en diferentes ámbitos científicos, principalmente en síntesis orgánica, biología molecular y materiales, siendo una metodología realmente versátil a la hora de sintetizar compuestos de diversa naturaleza.^{15, 16} En este caso, se utilizó cobre (I) para catalizar la reacción, observándose la formación de uno de los dos isómeros posibles para facilitar la purificación y la obtención de un mayor rendimiento.

Es de destacar que tanto el conjugado VP-2PE como el entrecruzante hidrolizable se han llevado a cabo mediante una adición de Michael-1,4 del monómero sintético VPNH₂ a un acrilato. Este es un acoplamiento muy conocido y de gran interés en química de polímeros,¹⁷ que ha permitido en esta tesis doctoral describir una ruta genérica de anclaje hidrolizable de fármacos hidroxilados (usando 2PE como molécula modelo), así como la obtención de un entrecruzante asimétrico hidrolizable no descrito anteriormente. Para la preparación de este entrecruzante se ha llevado a cabo la adición de Michael-1,4 de aminas sobre el aducto acrilato-metacrilato, cuya síntesis está descrita en bibliografía,^{18, 19} siendo una reacción selectiva al acrilato, dejando la función metacrílica intacta para su posible polimerización.

2. Experimental

2.1. Reactivos

Los compuestos utilizados como reactivos en la síntesis que a continuación se detalla se utilizaron sin previa purificación, a excepción de la N-vinil-2-pirrolidona (VP) de Sigma-Aldrich, que se destiló a presión reducida y se conservó a 4°C.

Para eliminar la hidroquinona añadida en determinadas reacciones, se utilizó un agente adsorbente de inhibidores de Sigma-Aldrich (*"Inhibitor removers"*).

2.2. Síntesis y caracterización de monómeros

2.2.1. Derivados mono-alquilados de VP

Sobre una disolución de butil litio (17.3 mL, 43 mmol) en 80 mL de THF anhidro a -78 °C y con agitación magnética, se añadieron 7 mL de diisopropilamina (50 mmol). Se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura de 0 °C y, después de 10 minutos, se volvió a enfriar hasta -78 °C. VP (5 mL, 43 mmol) fue añadida gota a gota a la disolución resultante y se dejó en agitación durante dos horas. Después, el bromuro de alquilo correspondiente (1,3-dibromopropano (4.5 mL, 43 mmol) o bromuro de propargilo (4.8 mL, 43 mmol)) fue añadido a la disolución, permitiendo posteriormente el aumento de la temperatura. En el caso de VPBr (Figura 1.2), se dejó que la mezcla alcanzase la temperatura ambiente y se dejó agitando durante 20 horas. Para el caso de VPgyl, se dejó alcanzar 0 °C y se mantuvo durante 5 horas bajo agitación para evitar la formación del producto dialquilado. Transcurrido dicho tiempo, la masa de reacción se hidrolizó con una mezcla de CH₂Cl₂/H₂O (1:1, 100 mL). Se separó la fase orgánica, y la acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2x50 mL), combinando las fases orgánicas y secándolas con sulfato sódico anhidro (Na₂SO₄). El sólido se eliminó por filtración simple y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo amarillento resultante fue purificado por columna cromatográfica usando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de hexano/acetato de etilo (5:1) como eluyente, resultando un aceite incoloro semicristalino en ambos casos. El rendimiento de la reacción fue del 30% para VPBr, y del 62% para VPgyl (Figura 1.2).

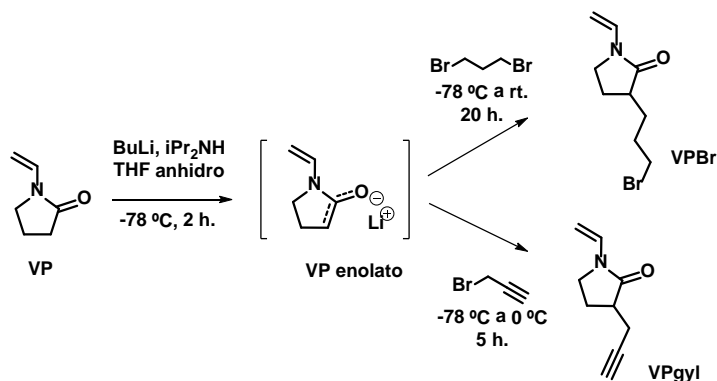


Figura 1.2: Esquema de la síntesis de los derivados de VP mono-alquilados VPBr y VPgyl.

a) 3-(3-bromopropil)-1-vinil-2-pirrolidona (VPBr)

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.08 (dd, 1H, N-CH=CH₂, J = 15.0 y 10.0 Hz), 4.44 (d, 1H, cis N-CH=CHH, J = 10.0 Hz), 4.40 (d, 1H, trans N-CH=CHH, J = 15.0 Hz), 3.51 (td, 1H, CO-N-CHH, J = 5.0 Hz), 3.47-3.36 (m, 3H, CO-N-CHH y CH₂-Br), 2.56-2.50 (m, 1H, CO-CH-CH₂), 2.34-2.27 (m, 1H, CO-CH-CHH), 2.05-1.91 (m, 3H, CO-CH-CHH y CH₂-CH₂-CH₂), 1.79-1.71 (m, 1H, N-CH₂-CHH), 1.63-1.54 (m, 1H, N-CH₂-CHH). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 174.42 (NCO), 129.38 (N-CH=CH₂), 94.36 (N-CH=CH₂), 42.75 (CO-N-CH₂), 41.56 (CO-CH), 33.26 (CH₂-Br), 30.32 (CH₂-CH₂-CH₂), 29.87 (N-CH₂-CH₂), 24.44 CO-CH-CH₂). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm^{-1}): 2944, 2881, 1699, 1633, 1426, 1388, 1328, 1268, 981, 851.

MS (ESI): m/z calculada 232.0332 y 234.0312 ($M+1$)⁺, m/z encontrada 232.0320 y 234.0301.

b) 3-propargil-1-vinil-2-pirrolidona (VPgyl)

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.08 (dd, 1H, N-CH=CH₂, J = 16.0 y 9.0 Hz), 4.46 (d, 1H, cis N-CH=CHH, J = 9.0 Hz), 4.42 (d, 1H, trans N-CH=CHH, J = 16.0 Hz), 3.56 (td, 1H, CO-N-CHH, J = 10.0 y 3.0 Hz), 3.41 (dt, 1H, CO-N-CHH, J = 10.0 y 8.0 Hz), 2.77-2.71 (m, 1H, CH-CO), 2.66 (ddd, 1H, CHH-C-CH, J = 17.0, 4.5 y 2.5), 2.48 (ddd, 1H, CHH-C-CH, J = 17.0, 4.5 y 2.5 Hz), 2.41-2.34 (m, 1H, CO-CH-CHH), 2.08-2.00 (m, 1H, CO-CH-CHH), 1.97 (t, 1H, C-CH, J = 2.5 Hz). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 172.96 (NCO), 129.39 (N-CH=CH₂), 94.70 (N-CH=CH₂), 80.93 (C≡CH), 70.00 (C≡CH), 42.81 (CO-N-CH₂), 41.36 (CO-CH), 23.40 (N-CH₂-CH₂), 20.21 (CH₂-C≡CH). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm^{-1}): 3293, 3252, 2886, 2117, 1694, 1629, 1427, 1389, 1328, 1315, 1268, 980, 851.

MS (ESI): m/z calculada 150.0913 ($M+1$)⁺, m/z encontrada 150.0914.

2.2.2. Derivados VP-amina a partir de VPBr

a) 3-(3-ftalimidopropil)-1-vinil-2-pirrolidona (VPPhta)

VPBr (2 g, 8.63 mmol) se disolvió en DMF (10 mL). Ftalimida potásica (3.26 g, 17 mmol) se añadió a la disolución, con una cantidad catalítica de bromuro de tetrabutilamonio (0.1 g, 0.31 mmol) y se dejó bajo agitación magnética durante 40 horas a la temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 20 mL de agua destilada y se filtró a presión reducida, lavando el sólido con agua (3x20 mL) resultando un sólido blanco. El rendimiento de la reacción fue del 98% (Figura 1.3).

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.83 (dd, 2H, C-H, J = 5.5 y 3.0 Hz), 7.70 (dd, 2H, C-H, J = 5.5 y 3.0 Hz), 7.07 (dd, 1H, N-CH=, J = 16.0 y 9.0 Hz), 4.42 (d, 1H, cis N-CH=CHH, J = 9.0 Hz), 4.38 (d, 1H, trans N-CH=CHH, J = 16.0 Hz), 3.72 (t, 2H, CH₂-N(CO)₂, J = 10.0 Hz), 3.49 (td, 1H, N-CHH, J =10.0 y 3.0 Hz), 3.37 (dt, 1H, N-CHH, J = 10.0 y 8.0 Hz), 2.55 (qd, 1H, CH-CO, J = 9.0 y

5.0 Hz), 2.33-2.27 (m, 1H, CO-CH-CHH), 1.96-1.89 (m, 1H, CHH-CH-CH₂), 1.82-1.69 (m, 3H, CH₂-CH₂-CH₂ y CO-CH-CHH), 1.47-1.39 (m, 1H, CHH-CH₂-CH₂). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz): δ= 174.50 (NCO), 168.33 (CH₂-N(CO)₂), 133.90 (CH-CH-CH-CH), 132.03 (C-C), 129.42 (N-CH=CH₂), 123.19 (CH-CH-CH-CH), 94.24 (N-CH=CH₂), 42.75 (CO-N-CH₂), 41.83 (CO-CH), 37.62 (CH₂-N(CO)₂), 28.31 (N-CH₂-CH₂), 26.20 (CH₂-CH₂-CH₂), 24.39 (CO-CH-CH₂). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm⁻¹): 2943, 2883, 1771, 1698, 1630, 1425, 1394, 1328, 1266, 1051, 982, 851, 718.

MS (ESI): m/z calculada 299.1390 (M+1)⁺, m/z encontrada 299.1388.

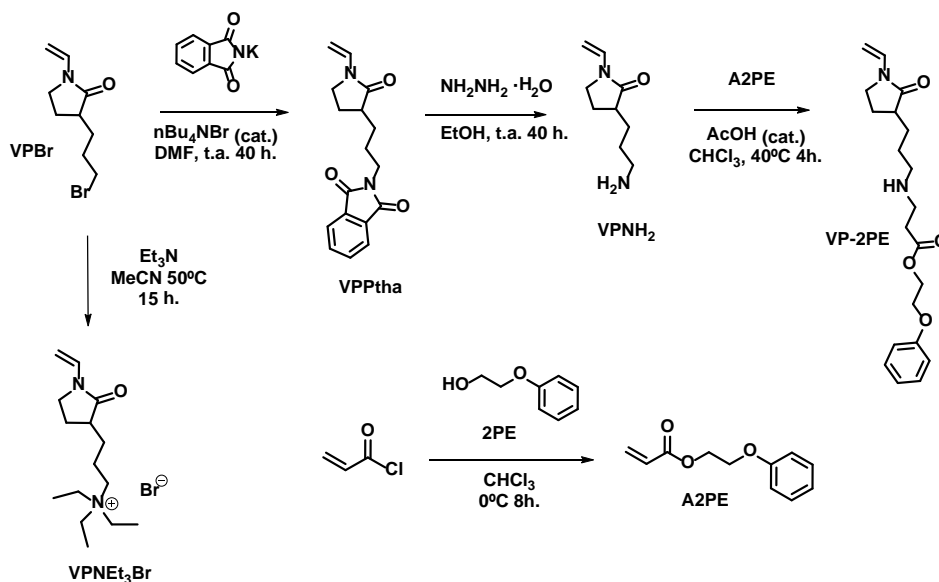


Figura 1.3: Esquema de la síntesis de los monómeros derivados de VPBr.

b) 3-(3-aminopropil)-1-vinil-2-pirrolidona (VPNH₂)

VPPhta (2.57 g, 8.63 mmol) e hidracina monohidrato ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (6.40 mL, 130 mmol) se disolvieron en EtOH (270 mL) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente. A las pocas horas, la aparición de un sólido blanco (grupo saliente) disperso en el seno de la reacción indicó el progreso de la misma. Tras 40 horas, el sólido blanco se separó de la mezcla por filtración simple, evaporando posteriormente el disolvente a presión reducida. 250 mL de dietiléter se añadió al resto, apareciendo algún resto más de grupo saliente. Después de una segunda filtración, la mezcla se secó sobre MgSO_4 anhidro. El sólido se eliminó por filtración y el disolvente se eliminó a presión reducida, resultando un líquido semicristalino amarillo pálido. El rendimiento de la reacción fue del 95% (Figura 1.3).

¹H RMN (DMSO-d₆, 500 MHz): δ= 6.88 (dd, 1H, C-H, 15.0 y 9.0 Hz), 4.45 (d, 1H, trans N-CH=CHH, J = 15.0 Hz), 4.42 (d, 1H, cis N-CH=CHH, J = 9.0 Hz), 3.43 (dt, 1H, N-CHH, J = 12.0 y

3.0 Hz), 3.30 (td, 1H, N-CHH, $J = 12.0$ y 6.0 Hz), 2.47-2.39 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ y CH-CO), 2.7-2.14 (m, 1H, CO-CH-CHH), 1.70-1.53 (m, 2H, CO-CH-CHH y $\text{CHH-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.43-1.17 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ y $\text{CHH-CH}_2\text{-CH}_2$). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

^{13}C RMN (DMSO-d_6 , 125 MHz): $\delta = 175.74$ (NCO), 129.52 (N-CH=CH $_2$), 95.55 (N-CH=CH $_2$), 43.22 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 42.12 (CO-N-CH $_2$), 41.72 (CO-CH), 30.50 (N-CH $_2\text{-CH}_2$), 28.47 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 24.30 (CO-CH-CH $_2$). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm^{-1}): 3356, 2935, 2870, 1690, 1632, 1574, 1488, 1454, 1427, 1389, 1324, 1267, 982, 851, 820, 751, 723.

MS (ESI): m/z calculada 169.1335 ($\text{M}+1$) $^+$, m/z encontrada 169.1329.

c) Acrilato de 2-fenoxietilo (A2PE)

Sobre una disolución de 0.45 mL de 2PE (3.62 mmol) en 5 mL de CHCl_3 a 0°C y con agitación magnética, se añadió lentamente una disolución de 0.32 mL de cloruro de acrililoilo (3.62 mmol) en 2 mL de CHCl_3 . Al terminar la adición, se dejó agitar durante 8 horas a esa temperatura. Después de ese tiempo, se lavó el bruto de la reacción con una disolución acuosa de NaOH 0.1M (2x20 mL). Posteriormente, la fase orgánica se secó con MgSO_4 anhidro, y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose un líquido transparente. El rendimiento de la reacción fue del 90%.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.30$ (t, 2H, C-H, $J = 8.0$), 6.96 (m, 3H, C-H), 6.45 (d, 1H, $\text{CHH}=\text{CH-COO}$, $J = 16.0$ Hz), 6.17 (dd, 1H, $\text{CHH}=\text{CH-COO}$, $J = 16.0$ y 8.0 Hz), 5.86 (d, 1H, $\text{CHH}=\text{CH-COO}$, $J = 8.0$ Hz), 4.52 (t, 2H, COOCH_2 , $J = 4.0$ Hz), 4.22 (t, 2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2$).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 166.23$ (COO), 158.62 (C-O), 131.43 ($\text{CH}_2=\text{CH-COO}$), 129.66 (C-CH-CH-CH-CH), 128.24 ($\text{CH}_2=\text{CH-COO}$), 121.34 (C-CH-CH-CH), 114.79 (CH-C-CH), 94.14 (N-CH=CH $_2$), 65.98 ($\text{COO-CH}_2\text{CH}_2\text{-O}$), 63.08 (COO-CH_2).

FTIR (cm^{-1}): 3041, 2958, 2878, 1723, 1637, 1620, 1598, 1588, 1497, 1457, 1408, 1297, 1272, 1243, 1182, 1173, 1085, 1062, 983, 943, 886, 809, 791, 752, 691.

MS (ESI): m/z calculada 193.0859 ($\text{M}+1$) $^+$, m/z encontrada 193.0868.

d) 3-(3-((3-oxo-3-(2-fenoxietoxi)propil)amino)propil)-1-vinil-2-pirrolidona (VP-2PE)

Una disolución de VPNH_2 (0.20 g, 1.19 mmol), 2-fenoxietil acrilato, A2PE (207.0 mg, 1.19 mmol) y ácido acético (25 μL) en CHCl_3 (2.5 mL) se agitó a 40°C durante 4 horas. Posteriormente, el disolvente se evaporó a presión reducida, y el crudo de la reacción se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice, usando una mezcla de acetato de etilo/hexano/trietilamina (30:10:2) como eluyente, obteniendo un sólido blanco como producto. El rendimiento de la reacción fue del 90% (Figura 1.3).

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 7.28$ (t, 2H, C-H, $J = 7.5$), 7.08 (dd, 1H, N-CH=CH $_2$, $J = 16.0$ y 9.0 Hz), 6.96 (t, 1H, C-H, $J = 7.5$), 6.92-6.89 (m, 2H, C-H), 4.45-4.36 (m, 4H, N-CH=CH $_2$ y COO-CH_2), 4.18-4.16 (m, 2H, $\text{COO-CH}_2\text{CH}_2\text{-O}$), 3.48 (td, 1H, N-CHH, $J = 10.0$ y 3.5 Hz), 3.36 (dt, 1H,

N-CHH, $J = 10.0$ y 8.0 Hz), 2.89 (t, 2H, NH-CH₂-CH₂-COO, $J = 6.5$ Hz), 2.65-2.60 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂-NH), 2.58 (t, 2H, CH₂-COO, $J = 6.5$ Hz), 2.49 (qd, 1H, CH-CO, $J = 9.0$ y 4.5 Hz), 2.29-2.23 (m, 1H, N-CH₂-CHH), 1.91-1.67 (m, 3H, N-CH₂-CHH, -NH- y CO-CH-CHH), 1.54 (quint, 2H, CH₂CH₂CH₂-NH, $J = 7.5$ Hz), 1.44-1.36 (m, 1H, CO-CH-CHH). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 174.90$ (NCO), 172.65 (COO), 158.39 (C-O), 129.48 (C-CH-CH-CH-CH), 129.40 (N-CH=CH₂), 121.15 (C-CH-CH-CH), 114.56 (CH-C-CH), 94.14 (N-CH=CH₂), 65.75 (COO-CH₂CH₂-O), 62.79 (COO-CH₂), 49.45 (CH₂CH₂CH₂-NH), 44.92 (NH-CH₂-CH₂-COO), 42.80 (CO-N-CH₂), 42.20 (CO-CH), 34.57 (NH-CH₂-CH₂-COO), 28.79 (CO-CH-CH₂), 27.56 (CH₂-CH₂-CH₂), 24.32 (N-CH₂-CH₂). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm⁻¹): 2929, 2881, 2825, 1733, 1697, 1630, 1599, 1589, 1494, 1426, 1387, 1327, 1245, 1168, 1120, 1060, 982, 849, 754, 692.

MS (ESI): m/z calculada 361.2116 (M+1)⁺, m/z encontrada 361.2122.

e) *N,N,N*-triethyl-3-(2-oxo-1-vinilpirrolidon-3-il) propan-1-amonio (VPN⁺)

A 15 mL de acetonitrilo se añadió 1 g. de VPBr (4.32 mmol) y 1.20 mL de trietilamina (8.64 mmol), junto con una cantidad catalítica de hidroquinona (10 mg). Se mantuvo a 50 °C durante 15 horas con agitación magnética. Transcurrido ese tiempo, se dejó alcanzar temperatura ambiente y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se lavó con dietiléter varias veces. Después, se disolvió el sólido en 10 mL de CHCl₃ y se pasó por una columna cuya fase estacionaria se usa para eliminación de inhibidores (para eliminar los restos de hidroquinona). Finalmente, se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose un polvo marrón brillante. El rendimiento de la reacción fue del 92% (Figura 1.3).

¹H RMN (D₂O, 500 MHz): $\delta = 6.92$ (dd, 1H, N-CH=CH₂, $J = 16.0$ y 9.0 Hz), 4.65 (m, 2H, N-CH=CH₂), 3.61 (td, 1H, N-CHH, $J = 10.0$ y 3.5 Hz), 3.49 (dt, 1H, N-CHH, $J = 10.0$ y 8.5 Hz), 3.25 (q, 6H, -N⁺-(CH₂CH₃)₃, $J = 7.5$ Hz), 3.21-3.11 (m, 2H, CH₂N⁺), 2.75-2.69 (m, 1H, CO-CH-CH₂), 2.35-2.29 (m, 1H, CO-CH-CHH), 1.83-1.63 (m, 4H, CO-CH-CHH, CH₂-CH₂-CH₂ y N-CH₂-CHH), 1.50-1.43 (m, 1H, N-CH₂-CHH), 1.22 (t, 9H, N⁺(CH₂CH₃)₃, $J = 7.5$ Hz). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

¹³C RMN (H₂O, 125 MHz): $\delta = 177.35$ (NCO), 128.23 (N-CH=CH₂), 97.66 (N-CH=CH₂), 56.02 (CH₂N⁺), 52.42 (N⁺(CH₂CH₃)₃), 43.54 (CO-N-CH₂), 41.85 (CO-CH), 26.81 (N-CH₂-CH₂), 23.22 (CH₂-CH₂-CH₂), 18.46 (CO-CH-CH₂), 6.47 (N⁺(CH₂CH₃)₃). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm⁻¹): 3128, 2978, 2944, 2876, 2679, 1684, 1630, 1518, 1491, 1455, 1432, 1389, 1325, 1290, 1268, 1247, 1205, 1191, 1165, 1031, 1013, 989, 946, 868, 828, 800, 749, 694.

MS (ESI): m/z calculada 253.2274 (M)⁺, m/z encontrada 253.2272.

2.2.3. Azido derivados de pirrolidina, piperidina y piperazina

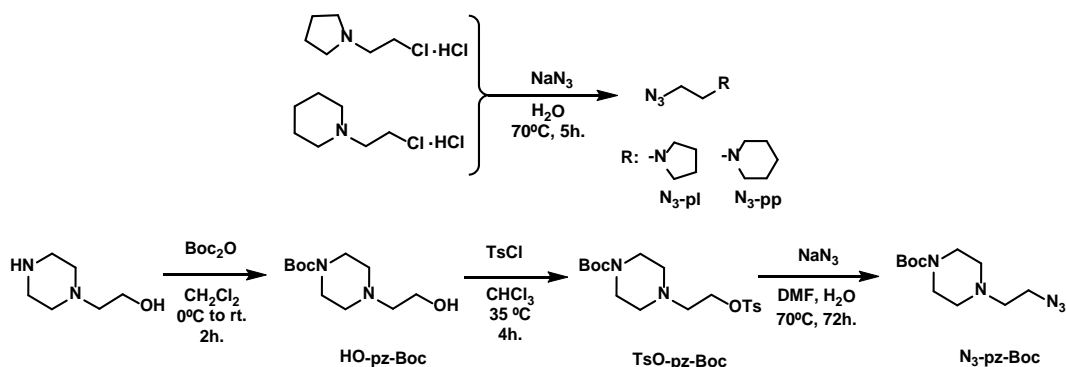


Figura 1.4: Esquema de síntesis de los azido derivados de las aminas cíclicas pirrolidina (N_3 -pl), piperidina (N_3 -pp) y piperazina protegida (N_3 -pz-Boc).

a) 1-(2-azidoetil)pirrolidina (N_3 -pl) y 1-(2-azidoetil)piperidina (N_3 -pp)

5 g de la sal hidrocloreuro correspondiente (1 equivalente) fueron disueltos en agua desionizada (140 mL). Posteriormente se añadió azida sódica (2 equivalentes) a la disolución, calentando la mezcla a 70 °C bajo agitación magnética. Después de 5 horas, se bajó la temperatura de la reacción con un baño de hielo, y KOH (1.1 equivalentes) fue añadido poco a poco en la mezcla. Finalmente, 150 mL de dietiléter fueron añadidos y la fase acuosa se extrajo dos veces más con dietiléter (2 x 100 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se secaron con sulfato sódico anhidro. El sólido se separó por filtración simple. Por razones de seguridad, estos azocompuestos nunca fueron secados completamente, añadiendo THF antes de eliminar el dietiléter a presión reducida. Suponiendo un rendimiento del 100% (Figura 1.4), se prepararon disoluciones del 0.7 M de azido compuesto en THF para el siguiente paso de la reacción (Figura 1.6).

N_3 -pl. FTIR (cm^{-1}): 2964, 2876, 2789, 2095, 1459, 1442, 1349, 1278, 1150, 1056, 955, 861.

N_3 -pp. FTIR (cm^{-1}): 2936, 2856, 2801, 2094, 1469, 1456, 1442, 1377, 1351, 1302, 1277, 1157, 1123, 1040, 931, 862, 758.

b) Terc-butyl 4-(2-hidroxietyl)piperazina-1-carboxilato (HO-pz-Boc)

Di-terc-butildicarbonato (10.9 mL, 46.09 mmol) fue disuelto en 35 mL de CH_2Cl_2 y se añadió lentamente a una disolución de 5 g de 1-(2-hidroxietyl)piperazina (5 g, 38.40 mmol) en 50 mL de CH_2Cl_2 . Durante la adición, la mezcla de reacción se mantuvo a 0 °C y, después, se dejó que alcanzase la temperatura ambiente. Después de 2 horas, una disolución de NH_4Cl saturado se usó para parar la reacción (30 mL). La fase orgánica se separó y la acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 40 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se secaron con sulfato sódico anhidro. El sólido se separó por filtración simple y el disolvente fue

eliminado a presión reducida. El residuo blanco resultante fue purificado por columna cromatográfica usando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de hexano/acetato de etilo (3:1) como eluyente, dando un sólido blanco como producto. El rendimiento de la reacción fue del 100% (Figura 1.4).

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 3.60 (t, 2H, HO-CH_2 , J = 5.6 Hz), 3.40 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NCOOtBu-CH}_2\text{-CH}_2$, J = 5.2 Hz), 2.83 (s, 1H, -OH), 2.51 (t, 2H, $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2$, J = 5.6 Hz), (t, 4H, $\text{CH}_2\text{-NCOOtBu-CH}_2$, J = 5.2 Hz), 1.24, (s, 9H, NCOOtBu).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 154.76 (NCOOtBu), 79.78 (HO-CH_2), 77.36 ($\text{NCOOC}(\text{CH}_3)_3$), 59.56 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NCOOtBu-CH}_2\text{-CH}_2$), 57.86 ($\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2$), 52.82 ($\text{CH}_2\text{-NCOOtBu-CH}_2$), 28.48 ($\text{NCOOC}(\text{CH}_3)_3$).

FTIR (cm^{-1}): 3437, 2975, 2933, 2864, 2811, 1692, 1457, 1419, 1365, 1290, 1244, 1167, 1126, 1077, 1054, 1003, 926, 865, 768.

MS (ESI): m/z calculada 231.1703 ($\text{M}+1$)⁺, m/z encontrada 231.1713.

c) *Terc-butil 4-(2-((tosiloxi)etil)piperazina-1-carboxilato (TsO-pz-Boc)*

HO-pz-Boc (3.3 g, 14.33 mmol) fue disuelto en 30 mL de CH_2Cl_2 y enfriado a 0 °C. Una disolución de cloruro de p-toluensulfonilo (2.79 g, 14.33 mmol) en 20 mL de CH_2Cl_2 fue añadida despacio, y la mezcla resultante fue agitada magnéticamente, permitiendo alcanzar 35 °C. Después de cuatro horas, la reacción se diluyó con 10 mL CH_2Cl_2 y se lavó tres veces con 10 mL de una disolución saturada de NaHCO_3 . La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 . El sólido se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida, dando un sólido amarillo pálido. El rendimiento de la reacción fue del 95% (Figura 1.4).

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 7.95 (d, 2H, Ar-H, J = 8.4 Hz), 7.40 (d, 2H, Ar-H, J = 8.40 Hz), 3.66 (t, 2H, O- CH_2 , J = 5.2 Hz), 3.47 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NCOOtBu-CH}_2\text{-CH}_2$, J = 4.8 Hz), 2.62 (t, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, J = 5.2 Hz), 2.53 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{-NCOOtBu-CH}_2$, J = 4.8 Hz), 2.48 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 1.45 (s, 9H, NCOOtBu).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 154.79 (NCOOtBu), 147.01, 141.85, 130.44, 127.25, 80.15 (HO-CH_2), 77.45 ($\text{NCOOC}(\text{CH}_3)_3$), 59.69 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NCOOtBu-CH}_2\text{-CH}_2$), 57.71 ($\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2$), 52.96 ($\text{CH}_2\text{-NCOOtBu-CH}_2$), 28.60 ($\text{NCOOC}(\text{CH}_3)_3$), 22.04 (CH_3).

FTIR (cm^{-1}): 3415, 2978, 2933, 2869, 2815, 1690, 1594, 1457, 1419, 1366, 1290, 1245, 1189, 1172, 1127, 1081, 1055, 1034, 1004, 926, 865, 813, 769, 699, 653.

MS (ESI): m/z calculada 385.1792 ($\text{M}+1$)⁺, m/z encontrada 385.1790.

d) *Terc-butil 4-(2-azidoetil)piperazina-1-carboxilato ($\text{N}_3\text{-pz-Boc}$)*

Se disolvieron 3.7 g de TsO-pz-Boc (9.73 mmol) en 50 mL of DMF. Después, 1.26 g de azida sódica (19.46 mmol) fueron disueltos en 10 mL de agua desionizada, y se añadió a la mezcla de reacción, llevada posteriormente hasta 70 °C y con agitación magnética. Después

de 72 horas, la mezcla se enfrió con ayuda de un baño de hielo, y KOH (1.20 g, 20 mmol) disuelto en 20 mL de agua fue añadido a la reacción. Finalmente, 100 mL de CH₂Cl₂ fueron añadidos a la mezcla, separando posteriormente la fase orgánica de la acuosa, que fue extraída con CH₂Cl₂ (2 x 100 mL). Las fases orgánicas fueron combinadas y secadas con Na₂SO₄ anhidro. En este caso también se siguió el mismo protocolo de seguridad que en la preparación de los compuestos N₃-pl y N₃-pp. Suponiendo un rendimiento del 100% (Figura 1.4), se prepararon disoluciones del 0.7 M de azocompuesto en THF para el siguiente paso de la reacción (Figura 1.6).

FTIR (cm⁻¹): 2978, 2933, 2814, 2099, 1692, 1457, 1416, 1365, 1281, 1241, 1167, 1126, 1004, 931, 866, 769.

2.2.4. Azido derivado de L-prolina

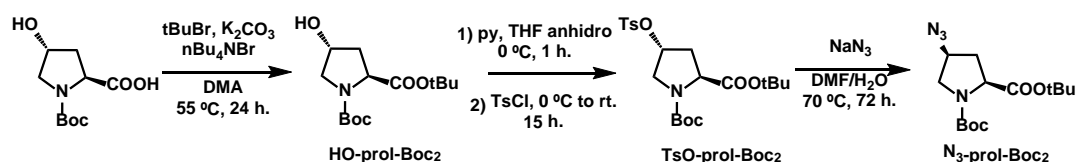


Figura 1.5: Esquema de síntesis del azido derivado de L-prolina (N₃-prol-Boc₂).

a) (2S,4R)-N-Boc-4-hidroxiprolinato de terc-butilo (HO-prol-Boc₂)

(2S,4R)-N-Boc-4-hidroxiprolina (5.0 g, 21.60 mmol) se disolvió en *N,N*-dimetilacetamida (90 mL) y se añadió bromuro de tetrabutilamonio (3.5 g, 11.00 mmol), K₂CO₃ (59.76 g, 432.40 mmol) y bromuro de terc-butilo (49.55 mL, 432.4 mmol). La mezcla se agitó a 55 °C durante 24 horas. Una vez finalizada la reacción se añadió agua hasta que se obtuvo una disolución clara. Se extrajo la mezcla con dieltiléter (3 x 100 mL), se secaron las fases orgánicas sobre sulfato sódico anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica utilizando gel de sílice y una mezcla hexano/acetato de etilo (1:1) como eluyente, obteniéndose el producto como un aceite incoloro. El rendimiento de la reacción fue del 70% (Figura 1.5).

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 4.44 (s, 1H, NCHCOO), 4.30–4.23 (m, 1H, HOCH), 3.60–3.39 (m, 2H, HOCHCH₂N), 2.30–2.20 (m, 1H, HOCHCHHCH), 2.06–1.97 (m, 1H, HOCHCHHCH), 1.54–1.31 (m, 18H, COOtBu x 2).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ = 172.27 (CHCOOtBu), 154.34 (NCOOtBu), 81.26 (CHCOOC(CH₃)₃), 80.31 (NCOOC(CH₃)₃), 70.26 y 69.37 (CHCOO), 58.63 (HOCH), 54.72 (HOCHCH₂N), 39.27 y 38.53 (HOCHCH₂CH), 28.45 y 28.11 (C(CH₃)₃ x 2).

FTIR (cm⁻¹): 3432, 2978, 2935, 2878, 1740, 1702, 1675, 1479, 1457, 1394, 1366, 1256, 1220, 1148, 1128, 1086, 1053, 992, 973, 938, 914, 854, 841, 771.

MS (ESI): m/z calculada 310.1625 (M+23)⁺, m/z encontrada 310.1633.

b) (2S,4R)-N-Boc-4-p-toluensulfoniloxiprolinato de terc-butilo (TsO-prol-Boc₂)

A una disolución enfriada a 0 °C de HO-pz-Boc₂ (4.0 g, 13.92 mmol) en piridina seca (17 mL), se añadió lentamente cloruro de p-toluensulfonilo (3.25 g, 16.70 mmol). La disolución se agitó a 0 °C durante 1 hora y a continuación se dejó alcanzar temperatura ambiente durante 24 horas. Terminada la reacción, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice, usando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo (5:1), obteniéndose un aceite amarillento. El rendimiento de la reacción fue del 75% (Figura 1.5).

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.79-7.77 (m, 2H, Ar-H), 7.37-7.34 (m, 2H, Ar-H), 5.04-4.98 (m, 1H, NCHCOO), 4.26-4.22 (m, 1H, TsOCH), 3.61-3.51 (m, 2H, TsOCHCH₂N), 2.57-2.36 (m, 4H, Ar-CH₃ y TsOCHCHHCH), 2.17-2.02 (m, 1H, TsOCHCHHCH), 1.44-1.41 (m, 18H, COOtBu x2).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ = 171.42 (CHCOOtBu), 153.86 y 153.55 (NCOOtBu), 145.39 (CSO₂), 133.68 y 133.44 (CH₃C), 130.21 (CH-C(CH₃)-CH), 127.90 (CH-C(SO₂)-CH), 81.76 (CHCOOC(CH₃)₃), 80.70 (NCOOC(CH₃)₃), 79.26 y 78.46 (CHCOO), 58.09 (TsOCH), 52.26 y 51.86 (TsOCHCH₂N), 37.42 y 36.10 (TsOCHCH₂CH), 28.39 y 28.10 (C(CH₃)₃ x2), 21.84 (CH₃).

FTIR (cm⁻¹): 2979, 2934, 2878, 1740, 1702, 1598, 1479, 1457, 1397, 1366, 1257, 1221, 1175, 1151, 1129, 1098, 1052, 1019, 993, 961, 900, 841, 816, 771.

MS (ESI): m/z calculada 464.1717 (M+23)⁺, m/z encontrada 464.1725.

c) (2S,4R)-N-Boc-4-azidoprolinato de terc-butilo (N₃-prol-Boc₂)

Sobre una disolución de TsO-pz-Boc₂ (3 g, 6.79 mmol) en DMF/agua (20:14 mL) se añadió azida sódica (0.88 g, 13.58 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 48 horas. Terminada la reacción, se añadieron 20 mL de CHCl₃ y 20 mL de una solución saturada de NaCl. La fase orgánica se separó y la acuosa se extrajo con CHCl₃ (2 x 10 mL). Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo (7:2), obteniéndose el producto como un aceite blanquecino. El rendimiento de la reacción fue del 82% (Figura 1.5).

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 4.32-4.16 (m, 2H, NCHCOO y N₃CH), 3.73-3.63 (m, 1H, N₃CHCHHN), 3.50-3.40 (m, 1H, N₃CHCHHN), 2.47-2.38 (m, 1H, N₃CHCHHCH), 2.16-2.14 (m, 1H, N₃CHCHHCH), 1.48-1.43 (m, 18H, COOtBu x2).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ = 170.85 y 170.54 (CHCOOtBu), 153.91 y 153.74 (NCOOtBu), 81.70 (CHCOOC(CH₃)₃), 80.41 (NCOOC(CH₃)₃), 59.34 y 58.40 (CHCOO), 58.24 (N₃CH), 51.30 y 50.97 (N₃CHCH₂N), 36.24 y 35.20 (N₃CHCH₂CH), 28.43 y 28.08 (C(CH₃)₃ x2).

FTIR (cm⁻¹): 2979, 2934, 2889, 2105, 1746, 1702, 1479, 1457, 1395, 1367, 1258, 1220, 1152, 1117, 1055, 1002, 907, 844, 770.

MS (ESI): m/z calculada 335.1717 ($M+23$)⁺, m/z encontrada 335.1725.

2.2.5. Derivados VP-amina a partir de VPgyl

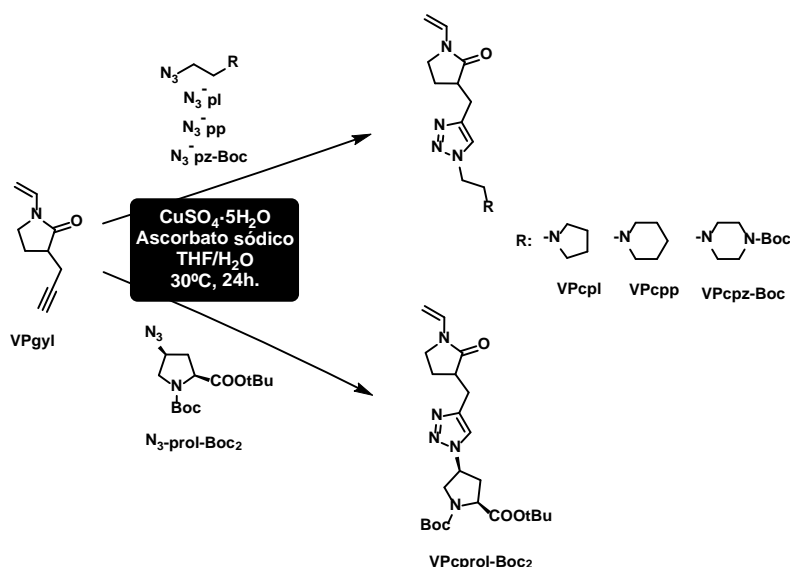


Figura 1.6: Esquema de la síntesis de los monómeros derivados de VPgyl mediante química “click” catalizada por cobre (I).

VPgyl (2.00 g, 13.4 mmol) y ascorbato sódico (0.53 g, 2.68 mmol) fueron añadidos al THF (10 mL). Por otro lado, sulfato de cobre (II) pentahidratado (1.02g, 4.02 mmol) se disolvió en 6 mL de agua desionizada. Estas dos disoluciones fueron añadidas a la vez sobre una tercera disolución formada por 13.4 mmol del azocompuesto correspondiente (N_3 -pl, N_3 -pp, N_3 -pz-Boc o N_3 -prol-Boc₂) en 20 mL de THF. La mezcla total se mantuvo a 30 °C con agitación magnética durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, la reacción fue parada con 5 mL de MeOH. Después, se añadieron 50 mL de una disolución acuosa de Na_2CO_3 0,1M, seguida de 50 mL de $CHCl_3$. Se separó la fase orgánica y la acuosa fue extraída dos veces con $CHCl_3$ (30 mL). Las diferentes fases orgánicas fueron combinadas y se secaron con sulfato sódico anhidro. El sólido se separó por filtración simple y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por columna cromatográfica. Para el caso de VPcpl, VPcpp y VPcpz-Boc se utilizó Al_2O_3 como fase estacionaria, y una mezcla de hexano/acetato de etilo/trietilamina (4:4:1) como eluyente. Para el caso de VPcpzol-Boc₂ se utilizó gel de sílice como fase estacionaria y una fase móvil con gradiente de hexano/acetato de etilo (1:1) a (0:1). Los rendimientos de reacción fueron del 90% para VPcpl, 82% para VPcpp, 80% para VPcpz-Boc, y de 75% para VPcpzol-Boc₂ (Figura 1.6).

a) 3-((1-(2-(pirrolidin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1-vinil-2-pirrolidona (VPcpl)

¹H RMN ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 7.47 (s, 1H, C-CH-N), 7.06 (dd, 1H, N-CH=CH₂, J = 16.0 y 9.0 Hz), 4.43-4.35 (m, 4H, CH-N-CH₂ and N-CH=CH₂), 3.34 (dd, 2H, CO-N-CH₂, J = 9.0 y 5.5 Hz), 3.18 (dd, 1H, CHH-C, J = 14.5 y 4 Hz), 3.00-2.90 (m, 4H, CHH-C, CH-CO y CH-N-CH₂-

CH_2), 2.53-2.50 (m, 4H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_2$), 2.33-2.27 (m, 1H, CO-CH-CHH), 2.00-1.93 (m, 1H, CO-CH-CHH), 1.78-1.75 (m, 4H, $\text{N-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2$). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 174.10 (NCO), 144.50 (C-CH-N), 129.30 (N-CH=CH $_2$), 122.48 (C-CH-N), 94.56 (N-CH=CH $_2$), 55.51 (CH-N-CH $_2$ -CH $_2$), 54.06 (N-CH $_2$ -(CH $_2$) $_2$ -CH $_2$), 49.33 (CH-N-CH $_2$ -CH $_2$), 42.79 (CO-N-CH $_2$), 42.60 (CO-CH), 26.49 (CO-CH-CH $_2$), 23.55 (N-CH $_2$ -(CH $_2$) $_2$ -CH $_2$), 23.42 (N-CH $_2$ -CH $_2$). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm^{-1}): 2957, 2879, 2798, 1698, 1632, 1550, 1428, 1389, 1327, 1270, 1048, 981, 851.

MS (ESI): m/z calculada 290.1979 ($\text{M} + 1$) $^+$, m/z encontrada 290.1975.

b) 3-((1-(2-(piperidin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1-vinil-2-pirrolidona (VPcpp)

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.50 (s, 1H, C-CH-N), 7.06 (dd, 1H, N-CH=CH $_2$, J = 16.0 y 9.0 Hz), 4.44-4.35 (m, 4H, CH-N-CH $_2$ y N-CH=CH $_2$), 3.37-3.31 (m, 2H, CO-N-CH $_2$), 3.18 (dd, 1H, CHH-C, J = 14 y 3.5 Hz), 3.00-2.89 (m, 2H, CHH-C y CH-CO), 2.44-2.38 (m, 4H, N-CH $_2$ -(CH $_2$) $_3$ -CH $_2$), 2.26-2.33 (m, 1H, CO-CH-CHH), 2.03-1.92 (m, 1H, CO-CH-CHH), 1.60-1.53 (m, 4H, N-CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$), 1.44-1.40 (m, 2H, N-(CH $_2$) $_2$ -CH $_2$). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 174.09 (NCO), 144.40 (C-CH-N), 129.33 (N-CH=CH $_2$), 122.61 (C-CH-N), 94.53 (N-CH=CH $_2$), 58.29 (CH-N-CH $_2$ -CH $_2$), 54.48 (N-CH $_2$ -(CH $_2$) $_3$ -CH $_2$), 47.75 (CH-N-CH $_2$ -CH $_2$), 42.79 (CO-N-CH $_2$), 42.64 (CO-CH), 26.47 (CO-CH-CH $_2$), 25.97 (N-CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$ -CH $_2$), 24.12 (N-(CH $_2$) $_2$ -CH $_2$ -(CH $_2$) $_2$), 23.41 (N-CH $_2$ -CH $_2$). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm^{-1}): 2933, 2851, 2781, 1697, 1631, 1551, 1428, 1390, 1327, 1269, 1045, 982, 851.

MS (ESI): m/z calculada 304.2137 ($\text{M} + 1$) $^+$, m/z encontrada 304.2132.

c) Terc-butil 4-(2-(4-((1-vinil-2-pirrolidon-3-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil) piperazin-1-carboxilato (VPcpz-Boc)

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 7.48 (s, 1H, C-CH-N), 7.05 (dd, 1H, N-CH=CH $_2$, J = 16.0 y 9.0 Hz), 4.44-4.35 (m, 4H, CH-N-CH $_2$ y N-CH=CH $_2$), 3.40-3.33 (m, 6H, CH $_2$ -NCOOtBu-CH $_2$ y CO-N-CH $_2$), 3.17 (dd, 1H, CHH-C, J = 10 y 4.5 Hz), 3.00 (dd, 1H, CHH-C, J = 15.0 y 7.5 Hz), 2.95-2.89 (m, 1H, CH-CO), 2.79 (t, 2H, CH-N-CH $_2$ -CH $_2$, J = 6.0 Hz), 2.41-2.38 (m, 4H, CH $_2$ -CH $_2$ -NCOOtBu-CH $_2$ -CH $_2$), 2.33-2.27 (m, 1H, CO-CH-CHH), 3.00-2.92 (m, 1H, CO-CH-CHH), 1.47-1.43 (m, 9H, NCOOtBu). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 174.03 (NCO), 154.62 (NCOOtBu), 144.49 (C-CH-N), 129.27 (N-CH=CH $_2$), 122.63 (C-CH-N), 94.63 (N-CH=CH $_2$), 79.74 (NCOOC(CH $_3$)), 57.50 (CH-N-CH $_2$ -CH $_2$), 52.83 (CH $_2$ -CH $_2$ -NCOOtBu-CH $_2$ -CH $_2$), 47.55 (CH-N-CH $_2$ -CH $_2$), 45.66 (CH $_2$ -CH $_2$ -NCOOtBu-CH $_2$ -CH $_2$), 42.77 (CO-N-CH $_2$), 42.58 (CO-CH), 28.38 (NCOOC(CH $_3$) $_3$), 26.35 (CO-CH-CH $_2$), 23.35 (N-CH $_2$ -CH $_2$). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm⁻¹): 2933, 2859, 2818, 1690, 1633, 1551, 1458, 1424, 1391, 1365, 1328, 1276, 1249, 1170, 1130, 1048, 1005, 865, 770.

MS (ESI): m/z calculada 405.2609 ($M + 1$)⁺, m/z encontrada 405.2609.

d) *Di-terc-butil (2S,4S)-4-(4-((2-oxo-1-vinilpirrolidin-3-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato (VPeprol-Boc₂)*

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.50 (s, 1H, C-CH-N), 7.07 (dd, 1H, N-CH=CH₂, J = 16.0 y 9.0 Hz), 5.10-5.02 (m, 1H, N=N-CH-CH₂-N), 4.46-4.10 (m, 4H, N-CH=CH₂, N-CH-CO₂tBu y N=N-CH-CHH-N), 3.85-3.75 (m, 1H, N=N-CH-CHH-N), 3.41-3.17 (m, 3H, CO-N-CH₂ y CO-CH-CHH), 2.98-2.86 (m, 3H, CO-CH-CHH, CO-CH y CHH-CH-CO₂tBu), 2.59-2.26 (m, 2H, CHH-CH-CO₂tBu y CO-N-CH₂-CHH), 3.04-2.89 (m, 1H, CO-N-CH₂-CHH), 1.45-1.41 (m, 18H, CO₂tBu x2). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz): δ = 173.95 (NCO), 170.54 (CHCO₂tBu), 153.66 (NCO₂tBu), 145.16 (C-CH-N), 129.28 (N-CH=CH₂), 120.76 (C-CH-N), 94.71 (N-CH=CH₂), 81.87 (NCOOC(CH₃)), 80.77 (CHCOOC(CH₃)), 58.12 (CHCOOC(CH₃)), 57.76 y 57.08 (N=N-CH-CH₂-N), 51.36 y 51.09 (N=N-CH-CH₂-N), 42.77 (CO-N-CH₂), 42.43 (CO-CH), 36.29 y 35.30 (CH₂-CH-CO₂tBu), 28.24 (NCOOC(CH₃)₃), 27.89 (CHCOOC(CH₃)₃), 26.55 (CO-CH-CH₂), 23.35 (N-CH₂-CH₂). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm⁻¹): 3138, 2978, 2933, 2888, 1742, 1698, 1633, 1551, 1479, 1456, 1393, 1327, 1270, 1222, 1153, 1117, 1042, 981, 956, 913, 844, 771.

MS (ESI): m/z calculada 462.2711 ($M + 1$)⁺, m/z encontrada 462.2699.

2.3. Síntesis y caracterización del entrecruzante asimétrico MVhid

Para la síntesis del entrecruzante MVhid (3-(3-((3-oxo-3-(2-metacrililoiloxietoxi)propil)amino)propil)1-vinil-2-pirrolidona), primeramente se sintetizó el entrecruzante metacrilato de 2-(acrililoiloxi)etilo (AOEMA) siguiendo el protocolo descrito en la literatura de Ma y col.¹⁸ Posteriormente, a una disolución de 0.55 g (3.0 mmol) de AOEMA en CHCl₃ (10 mL) se añaden 0.5 g (3.0 mmol) de VPNH₂ y ácido acético (40 μ L). Se agitó a 40 °C durante 4 horas. Posteriormente, el disolvente se evaporó a presión reducida, y el crudo de la reacción se purificó por columna cromatográfica en gel de sílice, usando una mezcla de acetato de etilo/hexano/trietilamina (30:10:2) como eluyente, obteniendo un aceite como producto. El rendimiento de la reacción fue del 90% (Figura 1.7).

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.07 (dd, 1H, N-CH=CH₂, J = 16.0 y 9.0 Hz), 6.12 (s, 1H, COO-C=CHH), 5.59 (s, 1H, COO-C=CHH), 4.43 (d, 1H, N-CH=CHH, J = 9.0 Hz), 4.39 (d, 1H, N-CH=CHH, J = 16.0 Hz), 4.34 (4H, s, COO-(CH₂)₂-), 3.49 (td, 1H, N-CHH, J = 10.0 y 3.5 Hz), 3.38 (dt, 1H, N-CHH, J = 10.0 y 8.0 Hz), 2.90 (2H, t, NH-CH₂-CH₂-COO, J = 6.5 Hz), 2.65-2.25 (m, 7H, CH₂CH₂CH₂-NH, CH₂-COO, CH-CO, N-CH₂-CHH y -NH-), 1.95-1.85 (m, 4H, -CH₃ y CO-CH-

CHH), 1.80-1.70 (m, 1H, N-CH₂-CHH), 1.65-1.56 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂-NH), 1.49-1.38 (m, 1H, CO-CH-CHH). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

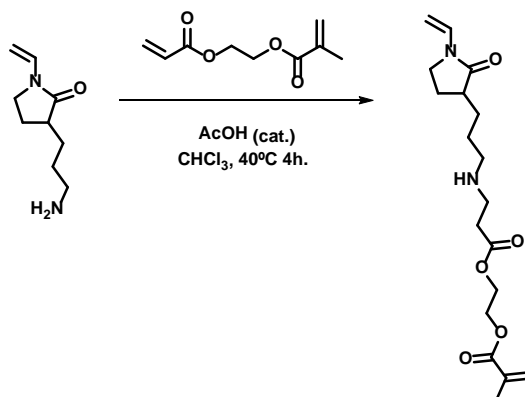


Figura 1.7: Esquema de síntesis del entrecruzante asimétrico hidrolizable MVhid portador de funcionalidades VP y metacrilato.

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ = 175.08 (NCO), 172.50 (COO), 167.25 (COO-C=CH₂), 136.02 (COO-C=CH₂), 129.62 (N-CH=CH₂), 126.27 (COO-C=CH₂), 94.44 (N-CH=CH₂), 62.47 y 62.37 (COO-CH₂CH₂-O), 49.53 (CH₂CH₂CH₂-NH), 44.95 (NH-CH₂-CH₂-COO), 42.99 (CO-N-CH₂), 42.34 (CO-CH), 34.32 (NH-CH₂-CH₂-COO), 29.04 (CO-CH-CH₂), 27.42 (CH₂-CH₂-CH₂), 24.55 (N-CH₂-CH₂), 18.43 (-CH₃). Espectro disponible en el Anexo 1 (Sección 1.1).

FTIR (cm⁻¹): 2935, 2859, 1720, 1701, 1633, 1453, 1427, 1389, 1329, 1267, 1160, 1125, 982, 851.

MS (ESI): m/z calculada 353.2071 (M + 1)⁺, m/z encontrada 353.2084.

2.4. Métodos y equipos

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y de ¹³C de los monómeros y del entrecruzante se realizaron utilizando un espectrómetro Varian-NMR system (400 y 500 MHz para ¹H, y 100 y 125 MHz para ¹³C respectivamente), usando CDCl₃, D₂O o DMSO con TMS (tetrametilsilano) como patrón interno. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en escala de partes por millón (ppm) relativos al TMS. Las constantes de acoplamiento (valores *J*) se dan en Hz, y la multiplicidad de spin están indicadas por los símbolos s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuartete), dd (doble doblete), dt (doblete de tripletes), ddd (doble doblete de dobletes), td (triplete de dobletes) y m (multiplete).

Los espectros de infrarrojo se realizaron utilizando un equipo Perkin Elmer RX-1 con un dispositivo de ATR (Reflectancia Total Atenuada) usando diamante/ZnSe como elemento de reflexión interna.

Los análisis por espectrometría de masas (MS) fueron realizados por ionización por electroespray (ESI) de alta resolución en un VG-AutoSpec espectrómetro de masas.

3. Resultados y discusión

La ruta sintética de derivatización mono-alkilada de la VP mediante la abstracción del hidrógeno en posición α al carbonilo del anillo de lactama proporciona un método sencillo y eficiente a la hora de obtener múltiples funcionalizaciones de este monómero.

Como ya se describió en un trabajo realizado en este mismo grupo,⁷ la base idónea para dicha abstracción del hidrógeno fue la LDA. Mediante la formación del enolato de la carboxiamida, especie altamente nucleófila, se produce un desplazamiento del bromuro de la especie electrofílica (1,3-dibromopropano o bromuro de propargilo, dependiendo de la reacción), obteniendo así los precursores principales de la síntesis de los monómeros aminados.

En la formación del derivado bromado, se utiliza un gradiente de temperaturas de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a temperatura ambiente (t.a.), mientras que en el caso del derivado de propargilo, de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este control térmico permite minimizar la dialquilación del anillo lactama. Cuando se utilizó el rango de temperaturas de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a t.a. en la reacción de obtención de VPgyl, se observaba una disminución del rendimiento del derivado monoalkilado, obteniéndose una mayor cantidad del derivado dialquilado. En el caso de VPBr a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, se observaba un rendimiento inferior al dado debido a una reacción incompleta. Además, para controlar esta dialquilación, se optó por utilizar una estequiometría VP:RBr (1:1); un exceso de VP podría dar la especie VP-R-VP en el caso de la reacción con los dos bromos del dibromo, mientras que un defecto de VP favorecería la formación del posible subproducto dialquilado.

Las especies derivadas de VPBr parten de un rendimiento bajo debido a que, en este primer paso, se obtiene un 30% del producto monobromado. Sin embargo, las modificaciones posteriores dieron resultados excelentes, donde el rendimiento fue superior al 95% después de la purificación de los productos (VPPtha, VPNH₂, VP-2PE y VPN+).

Las especies derivadas de VPgyl, al contrario que VPBr, tienen un rendimiento mayor debido al alto rendimiento de este primer paso (62%), así como a la utilización de reacción de ciclación Huisgens azida-alkino catalizada por cobre (I), conocida como química “click” y destacada por sus altos rendimientos. Los derivados de azida sintetizados en este trabajo no se aíslan debido a su baja estabilidad en seco, exceptuando N₃-prol-Boc₂, cuya relación (C+O)/N es suficientemente alta como para ser estable. Por ello, siempre se han considerado conversiones totales en las reacciones de obtención de N₃-pl, N₃-pp, N₃-pz-Boc y N₃-prol-Boc₂. Aun así, incluso con especies sin purificar, se obtuvieron resultados excelentes: siempre rendimientos superiores al 75% del derivado VP-amina correspondiente.

En el caso de la síntesis del entrecruzante MVhid, la adición de Michael-1,4 a la función acrílica frente a la función metacrílica se basa en el hecho de que los nucleófilos más débiles, como las aminas,^{17, 20, 21} tienen preferencia por el acrilato. Esta tendencia puede deberse a la existencia de una mayor densidad electrónica sobre el doble enlace de la función metacrílica debido a la presencia de un grupo metilo extra, siendo el acrilato un mejor grupo aceptor de electrones por parte del nucleófilo, en este caso la amina del monómero VPNH₂.

En cuanto a la función β -aminoéster del monómero VP2PE y del entrecruzante MVhid, se ha utilizado en trabajos anteriores donde se ha confirmado su sensibilidad hidrolítica dependiente del pH.^{22, 23} La labilidad hidrolítica de este éster, muy superior a otros ésteres alifáticos, se ha relacionado con una activación por parte de la amina en posición beta. Por ello, se aprovechará esta característica para preparar copolímeros de VP-2PE y VP hidrolizables en medios acuosos, capaces de liberar el precursor hidroxilado 2PE de un modo dependiente del pH (Capítulo 2). Del mismo modo, se obtendrán correes de VP y metacrilato de butilo (BMA) con el entrecruzante MVhid. Los puntos de entrecruzamiento son también hidrolizables en medios acuosos, por lo que se estudiará el proceso degradativo y su influencia en la estructura del material red. Estos estudios se analizarán en el Capítulo 6.

4. Conclusiones

Se han obtenido con éxito múltiples monómeros de VP funcionalizados con diferentes grupos amina de diferente naturaleza (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, así como aminas derivatizadas con estructuras portadoras de fármacos hidroxilados o de grupos polimerizables metacrilato), aplicando una ruta previamente desarrollada en el grupo para la obtención de derivados monoalquilados de VP, empleando posteriormente reacciones de sustitución, de adición o de cicloadición (química “click”).

Usando como producto de partida el monómero VPNH₂, se sintetizó mediante una adición de Michael 1,4 el monómero VP-2PE a partir de un derivado acrílico obtenido con el fármaco modelo 2PE, que servirá en el capítulo 2 como ejemplo de potencial aplicación en liberación controlada de fármacos de conjugados PVP-2PE. De la misma manera, se sintetizó un entrecruzante asimétrico con doble función VP-Metacrilato con el aducto acrilato-metacrilato (AOEMA), el cual se utilizará en el Capítulo 6 para la obtención de pseudo-correes degradables.

5. Bibliografía

1. L. White, S. Jönson, C. Hoyle and L. J. Mathias, *Polymer*, 1999, **40**, 6597-6605.
2. J. U. Engström, L. J. Lindgren and B. Helgee, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2006, **207**, 536-544.
3. J. U. Engström and B. Helgee, *Journal of combinatorial chemistry*, 2006, **8**, 355-360.
4. M. Bencini, E. Ranucci, P. Ferruti, C. Oldani, E. Licandro and S. Maiorana, *Macromolecules*, 2005, **38**, 8211-8219.
5. J. B. Kim, M. H. Jung and K. H. Chang, US Patent 5,750,680, 1998.
6. W. He, K. E. Gonsalves, J. H. Pickett and C. Halberstadt, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 75-79.

7. M. Pérez Perrino, R. Navarro, M. Gómez Tardajos, A. Gallardo and H. Reinecke, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2009, **210**, 1973-1978.
8. M. P. Perrino, R. Navarro, M. G. Tardajos, A. Gallardo and H. Reinecke, *European Polymer Journal*, 2010, **46**, 1557-1562.
9. M. G. Tardajos, L. García-Fernández, H. Reinecke, M. R. Aguilar, A. Gallardo and J. S. Román, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2012, **27**, 453-466.
10. M. Gómez-Tardajos, J. P. Pino-Pinto, C. Díaz-Soto, M. E. Flores, A. Gallardo, C. Elvira, H. Reinecke, H. Nishide and I. Moreno-Villoslada, *Dyes and Pigments*, 2013, **99**, 759-770.
11. M. G. Tardajos, I. Aranaz, M. n. Pérez, D. López, H. Reinecke, C. Elvira and A. Gallardo, *Macromolecules*, 2013, **46**, 5018-5025.
12. I. Aranaz, E. Martínez-Campos, M. E. Nash, M. G. Tardajos, H. Reinecke, C. Elvira, V. Ramos, J. L. López-Lacomba and A. Gallardo, *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, **2**, 3839-3848.
13. T. Trellenkamp and H. Ritter, *Macromolecules*, 2010, **43**, 5538-5543.
14. I. Cho and S. W. Jeong, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 1995, **196**, 869-875.
15. K. Nwe and M. W. Brechbiel, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 2009, **24**, 289-302.
16. J. E. Moses and A. D. Moorhouse, *Chemical Society Reviews*, 2007, **36**, 1249-1262.
17. B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller and T. E. Long, *Progress in Polymer Science*, 2006, **31**, 487-531.
18. X. Ma, J. Tang, Y. Shen, M. Fan, H. Tang and M. Radosz, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**, 14795-14803.
19. D. Demirgöz, R. Navarro, M. Pérez, H. Reinecke and A. Gallardo, *Journal of applied polymer science*, 2010, **115**, 896-900.
20. E. Juaristi and V. Soloshonok, *Enantioselective synthesis of beta-amino acids*, John Wiley & Sons, 2005.
21. M. Liu and M. P. Sibi, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 7991-8035.
22. D. M. Lynn and R. Langer, *Journal of the American Chemical Society*, 2000, **122**, 10761-10768.
23. A. Metters and J. Hubbell, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 290-301.

CAPÍTULO 2
PVP FUNCIONALIZADA CON AMINA
PRIMARIA Y SU POSIBLE APLICACIÓN EN
LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

CAPÍTULO 2: PVP FUNCIONALIZADA CON AMINA PRIMARIA Y SU POSIBLE APLICACIÓN EN LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

1. Introducción

Como se mencionó en la Introducción General de este trabajo, la síntesis de los polímeros derivados de VP funcionalizados con grupos amina se realizará mediante la aproximación “*bottom-up*” de polimerización de precursores monoméricos seleccionados y de control de carga mediante simple ajuste composicional de dichos precursores. En esta tesis todos los polímeros se han preparado mediante polimerización radical convencional, la cual es una tecnología sintética muy simple y versátil, que permite obtener polímeros de alto peso molecular en condiciones suaves e incluso, si las solubilidades de las especies lo permiten, en agua. En el Anexo 2 se describe en detalle este tipo de polimerización. El adjetivo “convencional” es usado para diferenciarla de la polimerización radical controlada, en la cual existe un control sobre la desactivación de los macrorradicales activos que permite la obtención de cadenas de tamaño definido y de baja dispersidad, copolímeros de bloque o extremos de cadena funcionales.¹ Esta técnica es superior pero más compleja y cara, y menos escalable que la convencional.

En este capítulo se describe la preparación de PVP portador de aminas primarias alifáticas, con una carga de amina controlada y a medida, mediante copolimerización radical convencional de VP y del monómero VPPhta descrito en el Capítulo 1, el cual tiene el grupo amina primaria protegida. Esta protección ha sido necesaria para evitar que su forma libre interfiera en la polimerización.

La incorporación de aminas primarias alifáticas como grupos laterales en cadenas de PVP podría ser extremadamente útil en muchas de las aplicaciones ya mencionadas en la Introducción General. Las aminas primarias alifáticas son ciertamente una de las primeras opciones para la conjugación de polímeros y biomateriales,² lo que permite la preparación de polímeros portadores de fármacos con PVP como cadena principal para su aplicación en alimentos, surfactantes o nanomateriales terapéuticos similares a los de PHPMA.³ Además, estas aminas primarias son cationizables y por lo tanto su incorporación al polímero no iónico de PVP proporciona cargas positivas en medios acuosos a pHs por debajo del pK_a de la amina. Estas cargas pueden modular la interacción del polímero con entidades biológicas tales como el ADN o con la superficie celular. Polímeros como el quitosano o la poli-L-lisina, portadores de aminas primarias cationizables, tienen una fuerte afinidad a los componentes con carga negativa de la membrana celular^{8,9} participando e influyendo en ciertos procesos biológicos como, por ejemplo, agentes antitrombogénicos¹⁰ o antimicrobianos.^{11,12} Otras aminas primarias también han sido incorporadas a la formulación de lentes de contacto para aportar propiedades antibacterianas.¹³

La forma libre de $VPNH_2$, aunque es difícilmente polimerizable como se ha mencionado antes, puede ser muy útil para obtener conjugados VP-compuesto activo precursores de conjugados soluble en agua basados en PVP (mediante copolimerización). En este campo de la bioconjugación, PVP fue

el primer polímero elegido para preparar un conjugado polímero-fármaco como se describió anteriormente.⁴ PVP es un soporte muy atractivo en tratamientos contra el cáncer por su alto tiempo de residencia en plasma y su reducida distribución tisular comparado con otros polímeros sintéticos.⁵⁻⁸ La conjugación de diferentes entidades con PVP (o con otros polímeros neutros hidrosolubles como PEG) permite que sea el polímero el que controle la interacción con el entorno acuoso ofreciendo solubilidad y/o un entorno hidratado “blando” y libre de cargas. Al ser el polímero el responsable de la interacción con el medio, se pueden modular aspectos como la solubilidad, degradación, toxicidad, biodistribución, adsorción inespecífica de proteínas o su posible eliminación (por ejemplo por vía renal si el peso molecular no supera cierto límite).^{9, 10} Se ha descrito además que conjugados solubles con derivados anticancerígenos pueden beneficiarse de la imperfección de la vasculatura tumoral formada de “novo” y extravasar en esa área de una manera específica, en el llamado “*enhanced permeation retention effect*”-EPR.¹¹ En este trabajo, como prueba de concepto de la utilidad de VPNH₂ para preparar conjugados PVP-compuesto activo, se ha diseñado una nueva ruta sintética para preparar conjugados con moléculas portadoras de grupos hidroxilo mediante la reacción de adición de Michael-1,4 de la amina del VPNH₂ a acrilatos. Esta química proporciona una unión tipo β-aminoéster entre el fármaco y la cadena principal del polímero, la cual es hidrolizable en medio básico. Esta sensibilidad hidrolítica, junto al uso de PVP como aditivo alimentario y clarificante de bebidas (como se ha mencionado está aprobado por la FDA para este uso¹²), puede hacer a estos conjugados muy atractivos para administración oral y la liberación intestinal (pH básico) de fármacos hidroxilados.

Por tanto, en este capítulo se describe en primer lugar una ruta simple y versátil de síntesis de polímeros aminados basados en PVP mediante la copolimerización radical del monómero de amina protegida como grupo ftalimida (VPPhta) con VP, seguida de la reducción de los grupos laterales de ftalimida para dar el polímero aminado. En segundo lugar, el monómero VPNH₂ fue utilizado en el diseño de una nueva ruta sintética para preparar conjugados hidrolizables con el fármaco modelo 2-fenoxietanol (2PE), un preservativo (o conservante) y bactericida común que puede encontrarse en muchas formulaciones dermatológicas, cosméticas y farmacéuticas. Para el seguimiento de la liberación de dicho fármaco, se realizó un ensayo de hidrólisis in situ en medio acuoso a diferentes pHs monitorizado por ¹H RMN. Hay que recordar de nuevo que la aproximación “*bottom-up*” usada aquí tiene una excelente flexibilidad en el control de la funcionalización del polímero (en este caso, grupos amina o fármaco) mediante el ajuste de la relación de monómeros en la alimentación de la polimerización, siendo posible además conseguir una multifuncionalización del polímero incluyendo comonómeros extra en la reacción de polimerización. Además, en el Capítulo 4 se evalúa el uso de estos polímeros portadores de amina primaria como vectores no virales como agentes de transfección.

2. Experimental

2.1. Reactivos

La N-vinil-2-pirrolidona (VP) de Sigma-Aldrich se destiló a presión reducida y se conservó a 4°C. El azobisisobutironitrilo (AIBN) de Sigma-Aldrich se recrystalizó en etanol. Los derivados aminados de VP se sintetizaron como se describe en el capítulo 1. El resto de monómeros y disolventes se emplearon sin purificación previa.

2.2. Polimerizaciones

Todas las polimerizaciones que a continuación se detallan se llevaron a cabo disolviendo los monómeros en 1,4-dioxano extra puro en una concentración total de monómero de 1 M, con AIBN como iniciador térmico en concentración de 1.5×10^{-2} M. Una vez realizada la mezcla, se burbujeó nitrógeno sobre esta disolución durante 30 minutos y posteriormente se calentó a 60 °C durante 24 horas. Dependiendo del sistema, se purificaron por precipitación o diálisis en agua.

Polímeros obtenidos a partir de VPPhta

Se llevaron a cabo cuatro copolimerizaciones de VPPhta y VP utilizando diferentes relaciones molares de monómero en alimentación (F_{VPPhta}) de 0.2, 0.4, 0.6, y 0.8, así como los correspondientes homopolímeros de VPPhta y VP. Los polímeros obtenidos se purificaron por un ciclo de precipitación-disolución-precipitación en dietiléter-cloroformo-dietiléter, seguido de un secado a vacío hasta peso constante. Los polímeros portadores de grupos NH_2 se obtuvieron mediante la reducción correspondiente de los grupos ftalimida usando hidracina siguiendo el mismo protocolo que para la síntesis del monómeros $VPNH_2$ indicado en el Capítulo 1. Los polímeros obtenidos se purificaron por diálisis en agua con membranas de *cut-off* 1000 Da, seguida de liofilización.

Las fracciones molares de monómero VPPhta en el copolímero (f_{VPPhta}) se determinaron a partir de los espectros de 1H RMN en $CDCl_3$. Estos valores de f_{VPPhta} fueron estimados comparando el área de la banda de los protones aromáticos (8.0-7.5 ppm) con la del grupo de señales entre 3.4-2.9 ppm, correspondiente a los hidrógenos del anillo de lactama vecinales al nitrógeno de la VP y de VPPhta, usando las siguientes ecuaciones:

$$A_{8.0-7.5} = 4H_{VPPhta} \quad (\text{ec. 1})$$

$$A_{3.4-2.9} = 2H_{VP} + 2H_{VPPhta} \quad (\text{ec. 2})$$

$$f_{VPPhta} = \frac{H_{VPPhta}}{H_{VPPhta} + H_{VP}} 100 \quad (\text{ec. 3})$$

Además, asumiendo que la copolimerización está gobernada por el modelo terminal explicado detalladamente en el Anexo 2, se determinaron las relaciones de reactividad de las copolimerizaciones de VPPhta y VP en 1,4-dioxano. Para ello, se llevaron a cabo reacciones de copolimerización a baja conversión (aproximadamente 2 horas). Los copolímeros obtenidos se analizaron composicionalmente utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3, y se determinaron las relaciones de reactividad r_{VP} y r_{VPPhta} usando el software Copol,¹³ el cual lleva a cabo un ajuste no lineal de

mínimos cuadrados propuestos por Tidwell y Mortimer para encontrar las mejores relaciones de reactividad de acuerdo a las ecuaciones generales de copolimerización radical. Una vez determinadas las relaciones de reactividad, se usó el mencionado software Copol para predecir composicionalmente la evolución de las reacciones de copolimerización llevadas a cabo a alta conversión, mencionadas anteriormente.

Polímeros obtenidos a partir de VP-2PE

Como ejemplo de conjugado de PVP-2PE, se preparó un copolímero de VP-2PE y VP con una composición nominal en alimentación de VP-2PE (F_{VP-2PE}) de 0.2 usando el protocolo descrito anteriormente para la preparación de sistemas a alta conversión. El polímero obtenido se purificó por un ciclo de precipitación-disolución-precipitación en dietiléter-cloroformo-dietiléter, seguido de un secado a vacío hasta peso constante.

Las fracciones molares de monómero VP-2PE en el copolímero (f_{VP-2PE}) se determinaron a partir de los espectros de 1H RMN en $CDCl_3$. Estos valores de fueron estimados comparando el área de la banda centrada a 4.45 ppm correspondiente a los hidrógenos $-CH_2-OPh$ del conjugado con la banda 3.4-2.9 ppm asignadas previamente de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$A_{4.45} = 2H_{VP-2PE} \quad (ec. 4)$$

$$A_{3.4-2.9} = 2H_{VP} + 2H_{VP-2PE} \quad (ec. 5)$$

$$f_{VP-2PE} = \frac{H_{VP-2PE}}{H_{VP-2PE} + H_{VP}} \times 100 \quad (ec. 6)$$

2.3. Métodos y equipos

2.3.1. Estudio de la sensibilidad al pH de los polímeros aminados.

Los valores de las constantes de disociación pK_b de los polímeros fueron determinados mediante valoraciones ácido-base de disoluciones acuosas preparadas de los mismos (5 mg de polímero en 5 mL de NaCl 0.15 M). Mediante un pretratamiento con un volumen pequeño de una disolución acuosa de NaOH 1 M, se llevaron las disoluciones hasta pH 11.0 para asegurar la desprotonación total de los grupos amina del polímero. Una disolución acuosa de HCl 0.1 M fue utilizada para llevar a cabo la valoración usando volúmenes de 20 μ L con motivo de evitar la modificación de la fuerza iónica. Los cambios de pH del medio fueron medidos con un pHmetro SCHOTT® Instruments handylab pH11.

2.3.2. Hidrólisis del conjugado PVP-2PE

Los experimentos de degradación del copolímero PVP-2PE sintetizado previamente fueron llevados a cabo a diferentes pHs (5, 7 y 9) a 37 °C, siendo monitorizados in situ por 1H RMN en tampones fosfato de D_2O preparados a partir las disoluciones acuosas liofilizadas de las sales de fosfato correspondientes. Estos experimentos se realizaron en un equipo de resonancia magnética nuclear Varian 400 (400 MHz). Para realizar experimentos cuantitativos, se utilizaron las condiciones siguientes: se aplicó una secuencia de pulsos de 7 μ s equivalente a un ángulo de 90° y

120 s de tiempo de retardo para asegurar que se permite la relajación total de los protones y poder procesar los datos individuales. La velocidad de giro de las muestras fue de 7 Hz. La temperatura de la muestra se mantuvo a 37 °C usando un controlador de calor del equipo de RMN. El procedimiento experimental está descrito con más detalle en la referencia 14.¹⁴ Las señales aisladas a 4.30 y 4.16 ppm, que corresponden al grupo $-\text{COO}-\text{CH}_2-$ del conjugado PVP-2PE y al grupo $\text{HO}-\text{CH}_2-$ del compuesto 2PE libre respectivamente se utilizaron para determinar la relación de hidrólisis por comparación de sus áreas (Figura 2.8) de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$A_{4.30} = 2H_{\text{conjugado PVP-2PE}} \quad (\text{ec. 7})$$

$$A_{4.16} = 2H_{2\text{PE}} \quad (\text{ec. 8})$$

Y el porcentaje de liberación de 2PE se calculó mediante la ecuación

$$R = \frac{H_{2\text{PE}}}{H_{\text{conjugado PVP-2PE}} + H_{2\text{PE}}} \times 100 \quad (\text{ec. 9})$$

2.3.3. Otros métodos

Los espectros de ^1H RMN se realizaron en un espectrómetro Inova 300 (300 MHz) usando CDCl_3 o D_2O como disolvente a temperatura ambiente y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Los desplazamientos químicos se dan en escala de ppm relativos al TMS.

El peso molecular promedio en número (\bar{M}_n) y el índice de dispersidad (\bar{D}) (comúnmente llamado “índice de polidispersidad”) de los polímeros fueron medidos por cromatografía de permeación en gel (GPC) con un sistema cromatográfico Perkin Elmer equipado con un detector de índice de refracción de Waters modelo 2414, usando columnas Styragel (300 x 7.8 mm, 5 μm tamaño nominal de partícula) HR3 y HR5 Waters. DMF con 1 % LiBr fue usado como eluyente. Las medidas fueron realizadas a 70 °C a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min, usando una concentración de polímero de 4 mg/mL. La calibración del equipo fue realizada utilizando estándares de poliestireno monodisperso de pesos moleculares del rango de 2.0 and 9,000.0 kDa.

La estabilidad térmica de PVP y del conjugado PVP-2PE fueron estimadas por análisis termogravimétrico (TGA) realizado en equipo TGA modelo Q500, utilizando 6 mg de muestra, y un rango de temperaturas de 25 a 500 °C, a 10 °C/min y bajo una atmósfera de nitrógeno.

Mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), se realizó el análisis de la temperatura de transición vítrea (T_g) de PVP y del conjugado PVP-2PE en un equipo Perkin-Elmer DSC7 en atmósfera de nitrógeno, usando 12 mg de muestra y un rango de temperaturas de 30 a 200 °C y a 20 °C/min. La T_g fue medida en el segundo barrido de temperaturas y se tomó como dato el punto de inflexión de la región de transición de la T_g .

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis y caracterización de los polímeros

La preparación de la PVP funcionalizada con amina primaria se llevó a cabo copolimerizando la forma protegida de la amina, porque la estructura desprotegida VPNH_2 no polimerizó usando el procedimiento descrito, ni tampoco otros disolventes como DMF o agua. Esta amina primaria es en realidad un grupo muy reactivo que puede sufrir reacciones secundarias en la polimerización radical, así como interaccionar con la cadena creciente actuando como un agente de transferencia. Ello explica que ciertos monómeros portadores de aminas primarias (como metacrilatos y metacrilamidas comerciales) se suministren en forma de sal ácida. Sin embargo, debido a la labilidad del doble enlace vinílico de la VP, la obtención de esta sal ácida (tipo hidrocloreuro) no sería posible. Por ello, para la obtención de los polímeros derivados con grupos amina primaria, se siguió el proceso descrito por la Figura 2.1.

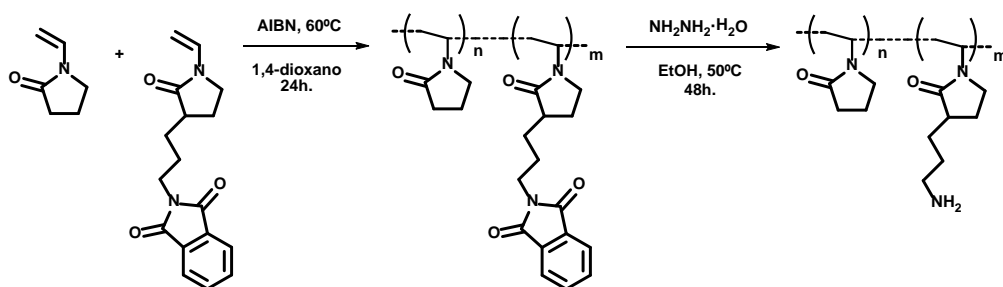


Figura 2.1: Procedimiento de obtención de los polímeros de PVP portadores del grupo amina primaria.

Mediante este procedimiento se prepararon los polímeros aminados recogidos en la Tabla 1. La composición de los copolímeros, f_{VPPhta} , fue determinada por ^1H RMN siguiendo las ecuaciones 1, 2 y 3. En todos los casos la composición del copolímero es muy cercana a la nominal de alimentación, lo cual indica que ambos monómeros son incorporados apropiadamente a las cadenas macromoleculares. La Figura 2.2 (arriba) muestra los espectros de ^1H RMN de los polímeros de PVP portadores del grupo ftalimida sintetizados con los diferentes grados de modificación. Los análisis de GPC de los mismos mostraron valores relativamente bajos de peso molecular promedio en número, con valores entre 15.0 y 20.0 kDa, así como índices de dispersidad ligeramente inferiores a 2.

Los espectros de ^1H RMN de los polímeros los portadores de amina primaria (tras desprotección) se muestran en la Figura 2.2 (abajo), donde destaca sobre todo la desaparición de las señales aromáticas (8.0-7.50 ppm) tras el tratamiento con hidracina.

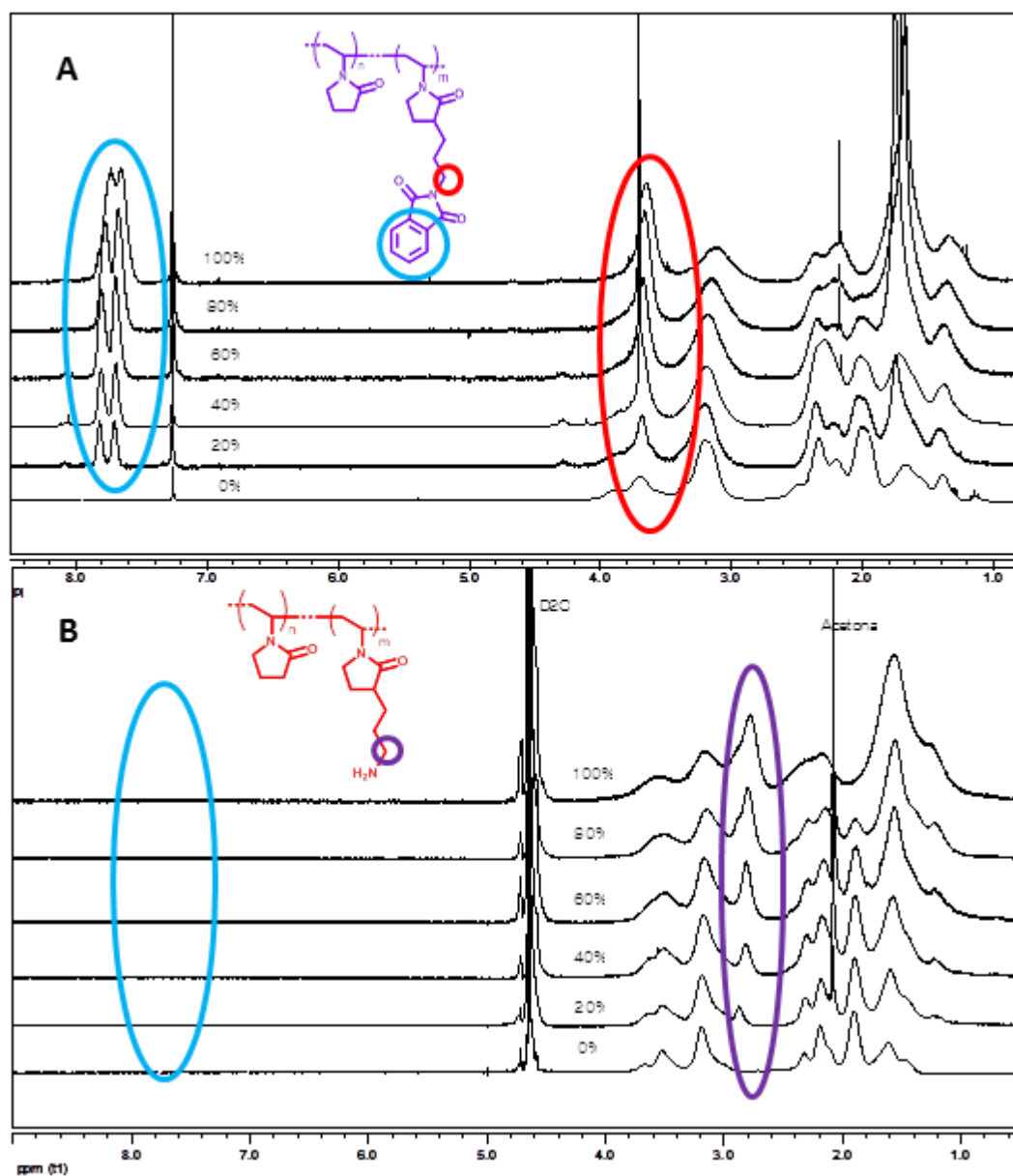


Figura 2.2: Espectros de ^1H RMN de los copolímeros poli-(VP-co-VPPhta) y homopolímero poli-VPPhta en CDCl_3 (A), y de los copolímeros poli-(VP-co-VPNH₂) y homopolímero poli-VPNH₂ en D_2O (B). Los espectros de PVP se incluyeron como referencia.

Tabla 2.1: Resultados composicionales y de GPC de los polímeros obtenidos de las copolimerizaciones de VP y VPPhta a conversión total.

F_{VPPhta}	f_{VPPhta}^a	\bar{M}_n (kDa) ^b	\bar{D}^b
0	0	17.5	1.6
0.20	0.17	15.3	1.6
0.40	0.37	17.1	1.6
0.60	0.60	20.0	1.8
0.80	0.75	18.3	1.6
1.00	1.00	17.7	1.6

^aCalculado por ¹H RMN. ^bDeterminado por GPC en DMF con LiBr 1% peso.

3.2. Determinación de las relaciones de reactividad y descripción teórica del progreso de la reacción.

Como se ha mencionado anteriormente, la copolimerización “homóloga” de VP con estructuras derivadas del propio VP debería dar lugar a copolímeros composicionalmente mucho más homogéneos que si se copolimeriza VP con monómeros activados como estirenos o metacrilatos.¹⁵⁻¹⁷ Sin embargo, la reactividad no tiene por qué ser idéntica, como lo indican estudios previos de la literatura con VP derivatizadas también en posición 3, en los que se obtuvieron relaciones de reactividad diferentes de 1 aunque cercanas a este valor.^{18, 19} Como todos los derivados de VP de esta tesis son derivados alifáticos en posición 3, las relaciones de reactividad obtenidas en este capítulo serán usadas en el resto de los sistemas para la descripción de la reacción cuando esta sea necesaria.

Tal y como se indica en mayor detalle en el Anexo 2, el modelo terminal considera que la reactividad del macrorradical en crecimiento depende de la naturaleza de la unidad terminal, y en el caso de las copolimerizaciones binarias se necesitan las mencionadas relaciones de reactividad para describir la reacción. Estas relaciones de reactividad vienen dadas por $r_1 = k_{11}/k_{12}$ y $r_2 = k_{22}/k_{21}$, donde k_{ij} ($i, j=1,2$) es la constante cinética de la adición de un monómero M_j a una cadena en crecimiento acabada en $\sim M_i$. Una relación de reactividad mayor o menor que 1 significa que la cadena en crecimiento acabada en $\sim M_i$ es más reactiva hacia el monómero 1 ó 2, respectivamente. Cuanto más cerca estén ambas de 1, menor será la reactividad diferencial en la reacción. Hay que tener presente sin embargo que el modelo terminal puede usarse para hacer una descripción composicional de la reacción pero es una aproximación de la realidad.²⁰

Como se indica en la parte experimental, para el cálculo de las reacciones de reactividad se usaron datos composicionales de reacciones a baja conversión, que están recogidos en la Tabla 2. La

baja conversión es necesaria para minimizar el error que conlleva el ajuste a la ecuación diferencial de copolimerización. El software Copol y el método Tidwell Mortimer dieron como relaciones de reactividad óptimas en el ajuste $r_{VPPha}=0.44$ y $r_{VP}=0.98$. Estos valores indican que macrorradicales en crecimiento acabados en VPPhta son ligeramente más reactivos frente a VP. En cualquier caso, los valores están relativamente cercanos a 1 (especialmente r_{VP}) por lo que las copolimerizaciones serán altamente homogéneas en composición como se muestra a continuación.

Tabla 2.2: Resultados composicionales de la copolimerización de VP y VPPhta a baja conversión.

F_{VPPha}	f_{VPPha}^a
0.20	0.17
0.40	0.35
0.60	0.51
0.80	0.68

^aCalculado por ¹H RMN.

La Figura 2.3 (izquierda) muestra el diagrama composicional teórico obtenido a partir de los valores experimentales de r_{VPPha} y r_{VP} , el cual está muy cercano a la diagonal (referencia de $r_1=r_2=1$). En la Figura 2.3 (derecha) se muestra el cálculo teórico de la composición instantánea de los copolímeros de PVP portadores de VPPhta en función de la conversión, usando las relaciones determinadas anteriormente, en el que se observa una aceptable homogeneidad composicional, sobre todo en las copolimerizaciones ricas en VP.

3.3. Estudio de la sensibilidad al pH de los polímeros aminados.

Se determinaron las regiones tampón de los diferentes copolímeros mediante una valoración con HCl 0.1 M con un tratamiento previo con una disolución de NaOH 1 M para la total desprotonación de los grupos amina presentes en las macromoléculas. Las curvas de valoración muestran que cuanto mayor es la cantidad de amina, mayor será la región tampón (Figura 2.4), obteniendo valores medios de pK_b en torno a 6. Esta región tampón depende de cada copolímero ya que la tendencia a la protonación de los grupos amina por la base durante la valoración depende del entorno de esos grupos NH_2 , pudiendo existir variaciones asociadas a efectos estéricos, repulsiones entre las cadenas ionizadas o por el efecto polielectrolítico.

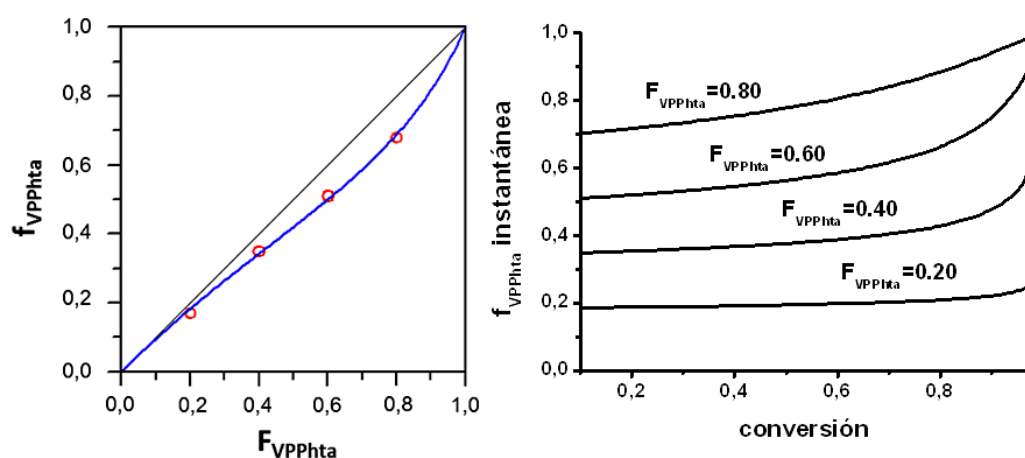


Figura 2.3: Diagrama de composición en la copolimerización de VP y VPPhta (izq.), y la fracción molar teórica instantánea de VPPhta en la copolimerización con VP en función de la conversión a diferentes fracciones molares en la alimentación.

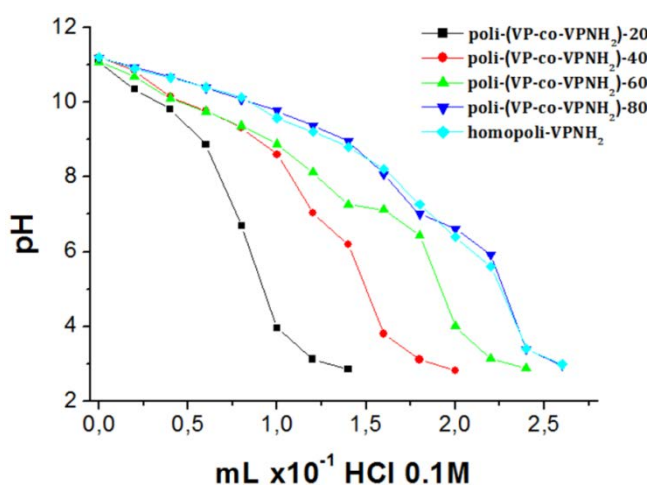


Figura 2.4: Curvas de valoración ácido-base de los copolímeros y homopolímero sintetizados con diferente grado de aminación.

3.4. Polímero obtenido a partir de VP-2PE

Basándonos en la utilidad del monómero VPNH_2 en la aproximación “*bottom-up*” para la obtención de conjugados PVP-fármaco mediante 1- preparación del precursor monomérico VP-fármaco y 2- copolimerización del mismo con VP, se ha diseñado una ruta para el anclaje de este monómero aminado a un compuesto portador de grupo hidroxilo mediante un espaciador

hidrolizable como se indica en la Figura 2.5. Como compuesto hidroxilado modelo se ha elegido el antibactericida 2-fenoxietanol (2PE).

Este diseño propone la transformación de un fármaco portador de un grupo hidroxilo a un éster acrílico, el cual es un buen aceptor de Michael al reaccionar con el monómero VP-NH₂, resultando un β-amino éster, especie que es más lábil que otros ésteres alifáticos debido a la presencia de un grupo amina en posición β al carbonilo.²¹ Los alquil-acrilatos son conocidos como buenos aceptores de Michael y reaccionan fácilmente en posición 1,4 con nucleófilos débiles como las aminas primarias.²² La síntesis de VP-2PE se describió en el Capítulo 1.

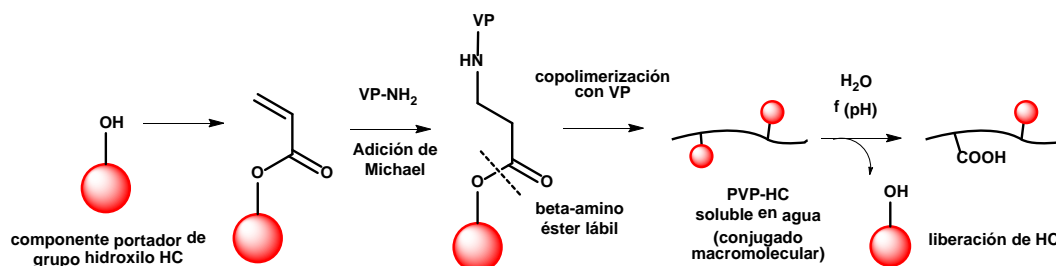


Figura 2.5: Ruta sintética diseñada para preparar conjugados PVP-fármaco hidrolizables.

El monómero VP-2PE demostró buena copolimerizabilidad con el monómero nativo de VP. Un copolímero nombrado como poli-(VP-co-VP-2PE₂₀) se preparó por polimerización radical convencional utilizando una relación molar de monómeros VP/VP-2PE de 4:1 ($F_{VP-2PE} = 0.20$).

Mediante ¹H RMN se analizó la composición de VP-2PE en el polímero (f_{VP-2PE}). En la Figura 2.6 se muestra el espectro típico del polímero PVP y del conjugado sintetizado en CDCl₃, mostrándose bandas características de las unidades VP-2PE en el espectro del conjugado polimérico, como las bandas aromáticas (7.4-6.5 ppm) o las bandas de los CH₂ de 2PE (4.5-4.0 ppm). Utilizando las ecuaciones 4, 5 y 6 se calculó una composición f_{VP-2PE} de 0.17, la cual es muy cercana a la relación de monómeros en la alimentación ($F_{VP-2PE} = 0.20$). Esto indica que el monómero VP2PE se ha incorporado casi por completo a lo largo de las cadenas.

Los análisis de TGA y DSC del polímero poli-(VP-co-VP-2PE₂₀) confirmaron la incorporación VP-2PE al polímero. Por un lado, el análisis por TGA mostró una pérdida de peso del 15% en el intervalo 270-310 °C, el cual no está presente en el termograma de control de PVP y que fue asignado a la pérdida de 2PE (Figura 2.7). El 15 % en peso corresponde con una composición molar del 17%, confirmando así el dato obtenido por ¹H RMN. Este resultado confirma además la labilidad del éster. Por otro lado, se analizó la Tg del conjugado polimérico por DSC mostrando una Tg de 78 °C, mucho menor que la Tg de la PVP control (170 °C) debido a la presencia de una cadena lateral larga que confiere una menor rigidez al polímero.

El peso molecular del copolímero fue determinado por GPC usando estándares de poliestireno, obteniendo valores de \bar{M}_n de 38.4 kDa y un \bar{D} de 2.0, valor característico de las polymerizaciones radicales convencionales.

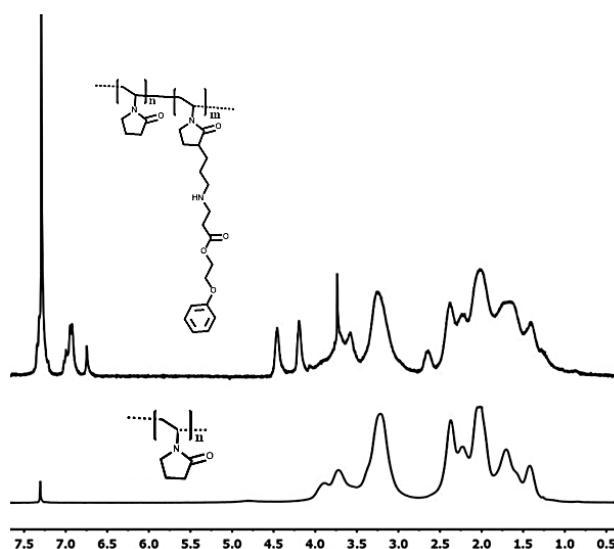


Figura 2.6: Espectros de ^1H RMN del conjugado poli-(VP-co-VP-2PE₂₀) en CDCl_3 . El espectro de PVP ha sido incluido como modelo comparativo.

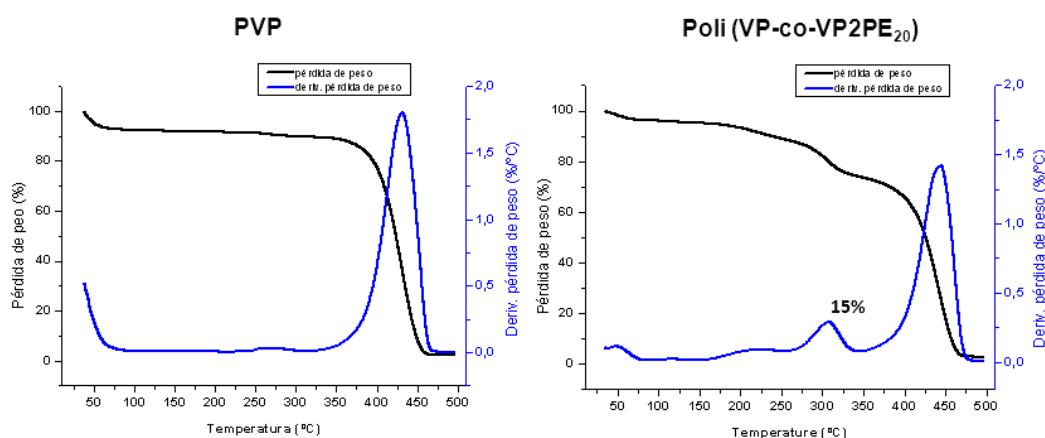


Figura 2.7: Curvas obtenidas del análisis termogravimétrico del conjugado poli-(VP-co-VP-2PE₂₀) y de PVP.

3.5. Hidrólisis del conjugado PVP-2PE

El comportamiento hidrolítico del conjugado poli-(VP-co-VP-2PE₂₀) ha sido estudiado por ^1H RMN in situ a 37 °C usando disoluciones de polímero en D_2O tamponadas a pH 5, 7 y 9. La Figura 2.8 (derecha) muestra el proceso de hidrólisis. Una unidad de VP portadora de un β -amino ácido carboxílico se forma como residuo después de la hidrólisis y liberación del fármaco 2PE. La

degradación puede ser monitorizada analizando la región del espectro de resonancia entre 4.0 y 4.5 ppm (Figura 2.7 izquierda).

En esta región, la hidrólisis produce la reducción progresiva de la banda ancha polimérica correspondiente a la señal procedente del $-\text{CH}_2-$ del conjugado antes descrito, apareciendo simultáneamente un triplete resuelto a 4.16 ppm correspondiente al mismo grupo $-\text{CH}_2-$ pero del compuesto no anclado. Estas señales han sido usadas para determinar la velocidad de liberación del fármaco, indicando el % de liberación frente al tiempo a diferentes pHs, representado en la Figura 2.9. Los detalles de los cálculos se encuentran en la sección 2.3 del apartado Experimental, utilizando las ecuaciones 7, 8 y 9.

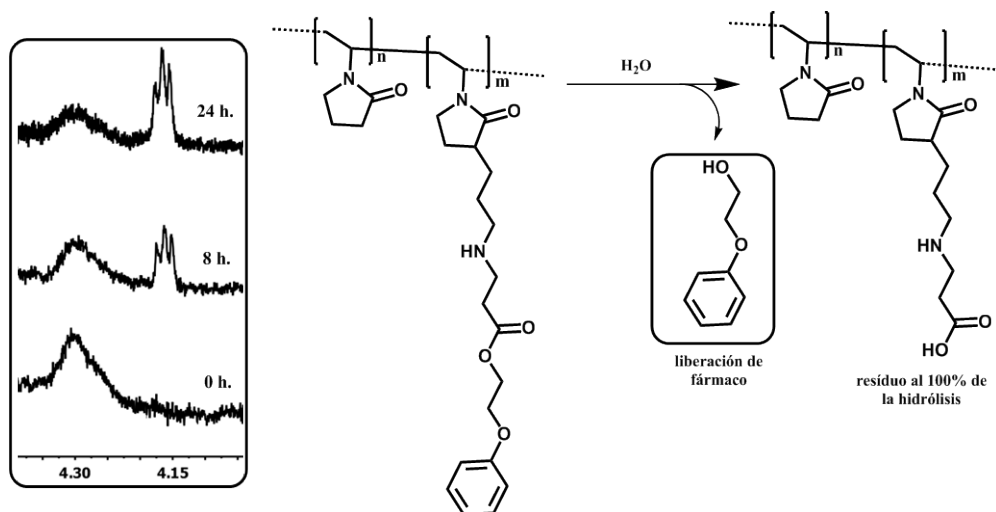


Figura 2.8: Esquema del proceso de hidrólisis y liberación del fármaco modelo 2PE (derecha). Detalles de las regiones de los espectros de ^1H RMN usadas para determinar la velocidad de liberación de 2PE para tres espectros adquiridos a 0, 8 y 24 horas a pH 9 (izquierda).

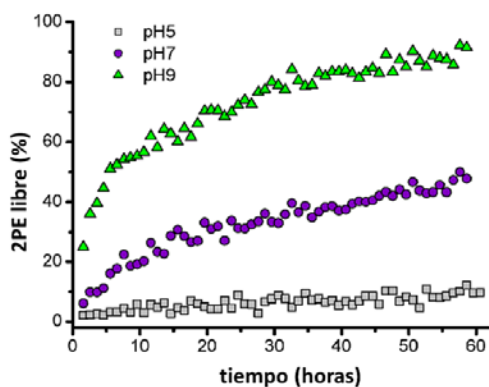


Figura 2.9: Porcentaje de liberación, R, frente al tiempo a diferentes pHs obtenidos por monitorización in situ de ^1H RMN.

Como era de esperar, hay una clara dependencia entre la velocidad de hidrólisis y el pH del medio de reacción. El tiempo de vida media de la hidrólisis del conjugado varía desde horas a pH 9, días a pH 7 y semanas a pH 5, debido a la conocida sensibilidad del éster a pH básico y la mayor activación del mismo por la presencia del grupo amino en posición β al carbonilo en su estado neutro.

4. Conclusiones

Se ha descrito una ruta sintética para la obtención de auténtica PVP funcionalizada con grupos amina primaria con una alta homogeneidad composicional. El grupo amina primaria es de gran interés, tanto en la forma monomérica como polimérica, por su alta reactividad como nucleófilo o por su capacidad para interaccionar con moléculas biológicas. Así, en el Capítulo 4 también se analizará el posible uso de los polímeros de PVP con grupos amina primaria como agentes no virales de transfección en terapia génica.

En relación a su alta reactividad, el grupo amina puede permitir obtener diferentes derivados y conjugados de PVP de interés en campos en los que la PVP *per se* es una macromolécula atractiva, como en la obtención de alimentos funcionales, agentes tensioactivos o nanovehículos terapéuticos. Como prueba de concepto de la utilidad de esta química para preparar conjugados PVP-fármaco, se ha diseñado una ruta de anclaje y de liberación hidrolítica de fármacos hidroxilados usando como molécula modelo el antibacteriano 2-fenoxietanol. Este diseño usa la reacción de adición de Michael, la cual da lugar a un anclaje a través de un éster hidrolizable. Este diseño se puede extender a otras moléculas portadoras de un grupo hidroxilo en su estructura como fenoles o polifenoles y dada su estabilidad en medio ácido y su labilidad en medio básico puede ser de gran interés para administración vía oral de medicamentos o alimentos funcionales, ya que PVP está aprobada por la FDA como aditivo alimentario.

* Parte de este trabajo se encuentra publicado en A. del Prado, R. Navarro, A. Gallardo, C. Elvira, H. Reinecke. 'Synthesis of randomly aminated polyvinylpyrrolidone and its use in the preparation of hydrolyzable conjugates' *RSC Advances*, **2014**, 4, 35950.

5. Bibliografía

1. W. A. Braunecker and K. Matyjaszewski, *Progress in Polymer Science*, 2007, **32**, 93-146.
2. N. Larson and H. Ghandehari, *Chemistry of Materials*, 2012, **24**, 840-853.
3. R. Duncan, *Advanced drug delivery reviews*, 2009, **61**, 1131-1148.
4. H. Jatzkewitz, *Z. Naturforsch*, 1955, **10**, 27-31.

5. H. Kamada, Y. Tsutsumi, Y. Yamamoto, T. Kihira, Y. Kaneda, Y. Mu, H. Kodaira, S.-i. Tsunoda, S. Nakagawa and T. Mayumi, *Cancer research*, 2000, **60**, 6416-6420.
6. Y. Kaneda, Y. Tsutsumi, Y. Yoshioka, H. Kamada, Y. Yamamoto, H. Kodaira, S.-i. Tsunoda, T. Okamoto, Y. Mukai, H. Shibata, S. Nakagawa and T. Mayumi, *Biomaterials*, 2004, **25**, 3259-3266.
7. R. Satchi-Fainaro, R. Duncan and C. M. Barnes, in *Polymer Therapeutics II*, Springer, 2006, pp. 1-65.
8. S. Tsunoda, H. Kamada, Y. Yamamoto, T. Ishikawa, J. Matsui, K. Koizumi, Y. Kaneda, Y. Tsutsumi, Y. Ohsugi and T. Hirano, *Journal of controlled release*, 2000, **68**, 335-341.
9. M. E. Fox, F. C. Szoka and J. M. Fréchet, *Accounts of chemical research*, 2009, **42**, 1141-1151.
10. C. Barros, *Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso*, Editorial Visión Libros, 2009.
11. Y. Matsumura and H. Maeda, *Cancer research*, 1986, **46**, 6387-6392.
12. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=173.55>, Last Update 08/21/2015.
13. R. N. Copol, *J. Chem. Educ*, 2004, **81**, 1210-1215.
14. M. R. Aguilar, A. Gallardo, M. d. M. Fernández and J. S. Román, *Macromolecules*, 2002, **35**, 2036-2041.
15. J. Brandrup, E. Immergut and E. A. Grulke, *Polymer Handbook*, 2003.
16. J. F. Bork and L. Coleman, *Journal of Polymer Science*, 1960, **43**, 413-421.
17. B. Reddy, R. Arshady and M. George, *European polymer journal*, 1985, **21**, 511-515.
18. M. Bencini, E. Ranucci, P. Ferruti, C. Oldani, E. Licandro and S. Maiorana, *Macromolecules*, 2005, **38**, 8211-8219.
19. M. G. Tardajos, L. García-Fernández, H. Reinecke, M. R. Aguilar, A. Gallardo and J. S. Román, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2012, **27**, 453-466.
20. M. Coote and T. Davis, *Progress in polymer science*, 1999, **24**, 1217-1251.
21. Y.-b. Lim, Y. H. Choi and J.-s. Park, *Journal of the American Chemical Society*, 1999, **121**, 5633-5639.
22. B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller and T. E. Long, *Progress in Polymer Science*, 2006, **31**, 487-531.

CAPÍTULO 3
POLÍMEROS SENSIBLES A LA TEMPERATURA
Y/O PH BASADOS EN PVPS PORTADORAS DE
AMINAS CÍCLICAS

CAPÍTULO 3: POLÍMEROS SENSIBLES A LA TEMPERATURA Y/O AL PH BASADOS EN PVPS PORTADORAS DE AMINAS CÍCLICAS

1. Introducción

Las estructuras de PVP portadoras de aminas terciarias derivadas de pirrolidina, piperidina y piperazina, que pueden obtenerse mediante la copolimerización de los monómeros correspondientes sintetizados en el Capítulo 1 (y en el caso del derivado de la piperazina, seguida de su desprotección) (Figura 3.1) con VP, tienen gran interés por su similitud estructural con otros polímeros con estructuras de tipo amina terciaria alifática que proporcionan simultáneamente en medio acuoso sensibilidad al pH y a la temperatura. Polímeros como poli-(N,N-dietilaminoetil metacrilato), poli-DEAEM,¹ poli-(N,N-dimetilaminoetil metacrilato), poli-DMAEM,² o poli-(etilpirrolidina metacrilato), poli-EPyM.³ Como ejemplo, el poli-DEAEM tiene valores LCST alrededor de 40 °C a pH 7.²⁻⁵

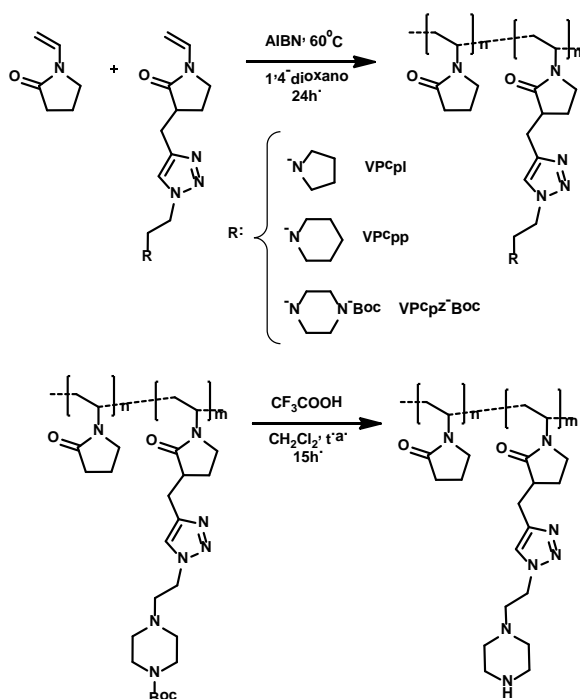


Figura 3.1: Esquema ilustrativo de las estructuras de monómeros y polímeros portadores de aminas cíclicas.

El término “sensibilidad a estímulos”, como pH o temperatura, se enmarca en el concepto de materiales inteligentes, que son aquellos que tienen la capacidad de cambiar su color, forma o propiedades electrónicas en respuesta a cambios o alteraciones del medio, como el pH y la

temperatura, pero también existen otros como la luz, el sonido, un campo eléctrico o magnético, la presencia de un compuesto químico o esfuerzos mecánicos, incluso pueden auto-repararse tras la acción de uno de estos estímulos después de provocar una rotura o alteración en su estructura.

Enfocándonos en macromoléculas sensibles en medio acuoso, la sensibilidad al pH se encuentra en estructuras portadoras de grupos ionizables como ácidos o aminas (los cuales tienen sensibilidad al pH), ya que la estructura y conformación de la macromolécula ionizada es muy diferente de la neutra (que puede ser no soluble).⁶ La sensibilidad a la temperatura en medio acuoso se encuentra en estructuras con un balance hidrofílico/hidrofóbico apropiado de forma que, por encima o por debajo de una temperatura crítica, las interacciones entre los grupos hidrofóbicos predominan y hacen que se forme una fase rica en polímero, mientras que en el otro lado de la temperatura crítica el medio es homogéneo, ya que predominan las interacciones polímero-disolvente (en este caso, agua). Si en este fenómeno las interacciones inter- e intramoleculares de los polímeros aumentan por encima de una temperatura crítica, dando lugar a la insolubilidad del polímero y su posterior precipitación, estamos hablando de la temperatura crítica de solución inferior o LCST (*Lower Critical Solution Temperature*), mientras que si el fenómeno es inverso hablamos de la temperatura crítica de solución superior o UCST (*Upper Critical Solution Temperature*). En la Figura 3.2 se muestran esquemáticamente estos dos fenómenos para un hipotético polímero que mostrase UCST y LCST. Esta sensibilidad (tanto al pH como a la temperatura) es una característica muy explotada en aplicaciones como sensores,⁷ ingeniería de tejidos y medicina regenerativa,⁸ liberación controlada de fármacos⁹⁻¹² o separación y purificación de sustancias.¹³⁻¹⁵

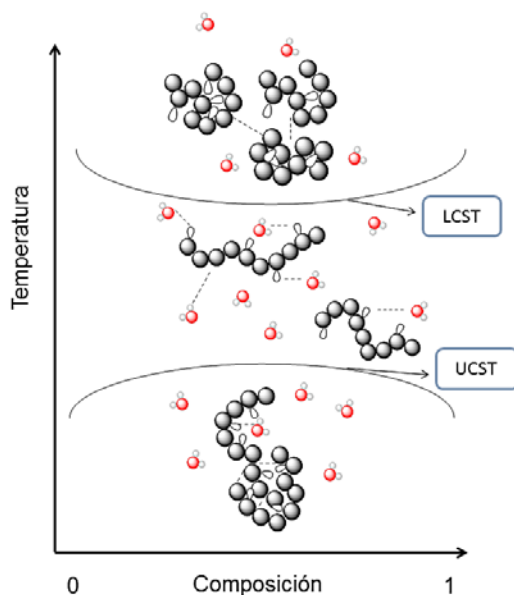


Figura 3.2: Diagrama de comportamiento típico de un polímero termosensible de dos componentes en disolución con temperaturas críticas de solución inferior (LCST) y superior (UCST), donde el polímero está totalmente solubilizado entre ellas.

Un tipo particular y muy interesante de sensibilidad en medio acuoso es el caso en el que el sistema es sensible a ambos estímulos, temperatura y pH. La obtención de estos materiales inteligentes puede ser llevada a cabo mediante la copolimerización de unidades termosensibles (como NIPAAm) y unidades ionizables (tales como los ácidos acrílico y metacrílico, o derivados de amina)¹⁶⁻²⁰, pero también existen unidades con estructuras sensibles a ambos estímulos, como las comentadas aminas terciarias. En estas estructuras se combinan las dos características mencionadas: amina ionizable y apropiado balance hidrofílico/hidrofóbico en la forma neutra de la amina.

Algunos derivados poliméricos de VP con sensibilidad térmica han sido preparados por copolimerización de VP con unidades monoméricas termosensibles como el NIPAAm.^{12, 21, 22} Además, intentando conseguir polímeros con cadena principal de PVP (en la línea de este trabajo de tesis), algunos sistemas de PVP con propiedades termosensibles se han sintetizado a partir del monómero nativo VP y diferentes monómeros alquilados derivados de VP.^{23, 24} Sin embargo, todavía no se han conseguido ningún material inteligente basado en PVP soluble en agua con una sensibilidad dual a la temperatura y al pH.

En este trabajo, se describe la síntesis y la caracterización de diferentes polímeros aminados con una cadena principal de PVP pura, mostrando algunos de ellos esta sensibilidad dual a la temperatura y al pH. Los homopolímeros y copolímeros han sido preparados por polimerización radical convencional del monómero VP con los monómeros de VP portadores de los grupos pirrolidina, piperidina y piperazina. Hay que recordar además que la aproximación “*bottom-up*” usada en esta tesis permitirá un fácil control de carga de la unidad sensible (mediante ajuste composicional en la reacción), carga que modulará en última instancia la sensibilidad de las macromoléculas al pH y a la temperatura en medio acuoso.

2. Experimental

2.1. Reactivos

La N-vinil-2-pirrolidona (VP) de Sigma-Aldrich se destiló a presión reducida y se conservó a 4 °C. El azobisisobutironitrilo (AIBN) de Sigma-Aldrich se recrystalizó en etanol. Los derivados aminados de VP se sintetizaron como se describe en el Capítulo 1. El resto de monómeros y disolventes se emplearon sin purificación previa.

2.2. Polimerizaciones

Todas las polimerizaciones que a continuación se detallan se llevaron a cabo disolviendo los monómeros en 1,4-dioxano extra puro en una concentración total de monómero de 1 M, con AIBN como iniciador térmico en concentración de 1.5×10^{-2} M. Una vez realizada la mezcla, se burbujeó nitrógeno sobre esta disolución durante 30 minutos y posteriormente se calentó a 60 °C durante 24 horas. Dependiendo del sistema, se purificaron por precipitación o diálisis en agua.

Polímeros obtenidos a partir de VPcpl, VPcpp, VPcpz-Boc

Se llevaron a cabo cuatro copolimerizaciones de VP y los derivados de triazol sintetizados en el Capítulo 1 (VPcpx: VPcpl, VPcpp y VPcpz-Boc), utilizando diferentes fracciones molares de monómero en alimentación (F_{VPcpx}) de 0.2, 0.4, 0.6, y 0.8, así como las homopolimerizaciones de VP y VPcpx (Figura 3.1). Los polímeros obtenidos se purificaron por diálisis en agua con membranas de “cut-off” 1000 Da, seguida de una posterior liofilización. Los polímeros portadores de grupos piperazina libre se obtuvieron mediante el tratamiento durante 15 horas con CF_3COOH (relación molar $CF_3COOH/VPcpz-Boc$ 4:1) disuelto en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente de los polímeros portadores de VPcpz-Boc (Figura 3.1). Después, el disolvente se eliminó con presión reducida y el residuo obtenido se disolvió en 5 mL de agua, se ajustó el pH a 7 con una solución acuosa de NaOH 1 M y los polímeros se purificaron por diálisis en agua con membranas de “cut-off” 1000 Da, seguida de una posterior liofilización.

Las fracciones molares de monómero aminado correspondiente en el copolímero (f_{VPcpx}) se determinaron a partir de los espectros de 1H RMN en $CDCl_3$. Estos valores fueron estimados comparando el área de la banda de los protones vecinales del grupo metileno vecinal al triazol (4.7–4.5 ppm) con la del grupo de señales entre 4.3–2.5 ppm correspondiente a protones de VP y VP modificada (Figura 3.3) usando las siguientes ecuaciones:

$$A_{4.7-4.5} = 2H_{VPcpx} \quad (ec. 1)$$

$$A_{4.30-2.50} = 3H_{VP} + 12H_{VPcpl} \quad (ec. 2)$$

$$A_{4.30-2.50} = 3H_{VP} + 8H_{VPcpp} \quad (ec. 3)$$

$$A_{4.30-2.50} = 3H_{VP} + 12H_{VPcpz-Boc} \quad (ec. 4)$$

$$f_{VPcpx} = \frac{H_{VPcpx}}{H_{VPcpx} + H_{VP}} 100 \quad (ec. 5)$$

2.3. Métodos y equipos

2.3.1. Estudio de la sensibilidad al pH de los polímeros aminados.

Los valores de las constantes de disociación pK_a de los polímeros fueron determinados mediante valoraciones ácido-base de disoluciones acuosas preparadas de los mismos (5 mg de polímero en 5 mL de NaCl 0.15 M). Mediante un pretratamiento con un volumen pequeño de una disolución acuosa de HCl 1 M, se llevaron las disoluciones hasta pH 3.0 para asegurar la protonación total de los grupos amina del polímero. Una disolución acuosa de NaOH 0.1 M fue utilizada para llevar a cabo la valoración usando volúmenes de 20 μ L con motivo de evitar la modificación de la fuerza iónica. Los cambios de pH del medio fueron medidos con un pHmetro SCHOTT® Instruments handylab pH11.

2.3.2. Análisis de la termosensibilidad de los polímeros aminados.

El análisis de la termosensibilidad de las soluciones acuosas de los polímeros se llevó a cabo midiendo la transmitancia óptica a una longitud de onda de $\lambda=600$ nm en soluciones tamponadas a diferentes valores de pH (7, 7.4, 8 y 9 obtenidas con tampones fosfato, mientras que la solución de pH 10 fue obtenida con un tampón de cloruro de amonio/amoniaco). Las medidas fueron realizadas usando una concentración de polímero de 2 mg/mL. El análisis se llevó a cabo en un espectrómetro de UV-visible Cary 3 BIO-Varian. La temperatura fue aumentada gradualmente desde 5 hasta 85 °C a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min. Los valores de LCST fueron estimados como el valor de temperatura a la cual la transmitancia de la disolución fuera 50%.

2.3.3. Otros métodos

Los espectros de ^1H RMN se realizaron en un espectrómetro Inova 300 (300 MHz) usando CDCl_3 o D_2O como disolvente a temperatura ambiente y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Los desplazamientos químicos se dan en escala de ppm relativos al TMS.

Los espectros de infrarrojo (FT-IR) fueron analizados en un equipo Perkin Elmer RX-1 con un accesorio de Reflexión Total Atenuada (ATR) usando un elemento de reflexión interna de diamante/ZnSe.

El peso molecular promedio en número (\bar{M}_n) y el índice de dispersidad (\bar{D}) de los polímeros fueron medidos por cromatografía de permeación en gel (GPC) con un sistema cromatográfico Perkin Elmer equipado con un detector de índice de refracción de Waters modelo 2414, usando columnas Styragel (300 x 7.8 mm, 5 μm tamaño nominal de partícula) HR3 y HR5 Waters. DMF con 1 % LiBr fue usado como eluyente. Las medidas fueron realizadas a 70 °C a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min, usando una concentración de polímero de 4 mg/mL. La calibración del equipo fue realizada utilizando estándares de poliestireno monodisperso de pesos moleculares del rango de 2.0 and 9000.0 kDa.

Los espectros de Raman fueron realizados con un equipo Renishaw InVia Reflex, con un microscopio óptico acoplado al sistema. La dispersión de Raman se excitó usando un diodo láser de longitud de onda $\lambda=785$ nm. El láser se centró en la muestra con un microscopio de objetivo 0,75 x 50. La potencia del láser, tiempo de exposición y el número de acumulaciones corresponden a 320 mW, 10 segundos y 5, respectivamente.

La temperatura de transición vítrea (T_g) de los polímeros se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un equipo calorímetro Perkin-Elmer DSC-7. Las medidas de T_g se realizaron por el calentamiento de las muestras desde 30 a 180 °C, y a una velocidad de 20 °C/min. La T_g fue medida en el segundo barrido de temperaturas y se tomó como dato el punto de inflexión de la región de transición de la T_g , usando entre 8-10 mg de muestra.

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis y caracterización de los polímeros obtenidos

La Figura 3.1 muestra el procedimiento seguido para la obtención de los tres tipos de polímeros de PVP funcionalizada con las aminas pirrolidina, piperidina y piperazina. A modo de ejemplo, en la Figura 3.3 se muestran los espectros de ^1H RMN de tres de los copolímeros sintetizados con una relación molar de monómero en alimentación de $F_{\text{VPcpx}} = 0.4$. El espectro del polímero nativo PVP se muestra a modo de referencia. Una banda a 7.70 – 7.40 ppm indica la presencia del triazol en la estructura polimérica, así como una banda a 4.60 – 4.40 ppm correspondiente al grupo metileno (k) vecinal al triazol. Además, el resto de las señales señaladas en los espectros de la Figura 3.3 muestran las bandas correspondientes a las diferentes funcionalidades laterales de aminas incorporadas a lo largo de las cadenas poliméricas. Las fracciones molares de los monómeros VPcpx en el copolímero (f_{VPcpx}), calculadas como se indica en la parte experimental, son muy próximas a los valores de F_{VPcpx} , lo cual indica que las unidades de VP y VPcpx son incorporadas apropiadamente a las cadenas macromoleculares (Tabla 3.1). Los espectros de ^1H RMN de todos los copolímeros y homopolímeros sintetizados a partir de VP y VPcpx realizados en CDCl_3 están incluidos en el Anexo 3 (Sección 3.1). En el caso particular de los polímeros portadores del grupo piperazina protegida, éstos fueron tratados con una disolución de CF_3COOH en CH_2Cl_2 durante 15 horas a temperatura ambiente para la desprotección de la amina secundaria, desapareciendo totalmente las bandas de los grupos protectores (p) a 1.80–1.40 ppm correspondientes a los grupos carbamatos. Los espectros de los polímeros de piperazina desprotegida realizados en D_2O están incluidos en el Anexo 3 (sección 3.2).

Los polímeros sintetizados también fueron caracterizados mediante espectroscopía de infrarrojo y Raman, donde una banda característica en torno a 1550 cm^{-1} (propia del enlace $\text{C}=\text{N}$ del triazol) demuestra también la incorporación de los monómeros aminados a la estructura del polímero. La intensidad de esta señal es más sensible en la espectroscopía Raman que en la de infrarrojo, ya que en esta última las bandas de los grupos carbonilos ($\text{C}=\text{O}$) del polímero son muy intensos y anchos, dificultando el análisis de las bandas del triazol. En la Figura 3.4 se representa como ejemplo los espectros de espectroscopía Raman de los copolímeros poli-(VP-co-VPcpl) así como el homopolímero poli-VPcpl. Normalizando los espectros en la banda de los grupos carbonilo (1670 cm^{-1}), se manifiesta un incremento en la intensidad de la banda centrada a 1552 cm^{-1} (vibraciones del enlace $\text{C}=\text{N}$ del grupo triazol), con un crecimiento concomitante del grado de funcionalización en los polímeros, siendo la intensidad de la banda del triazol directamente proporcional a f_{VPcpl} . Todos los espectros de IR, así como el análisis comparativo de los espectros de espectroscopía Raman, se encuentran en el Anexo 3 (Sección 3.3 y 3.4).

Los pesos moleculares promedio en número (\bar{M}_n) y los índices de dispersidad (\mathcal{D}) de los polímeros sintetizado se obtuvieron por GPC usando DMF con LiBr (1% peso) como eluyente. Los resultados están incluidos en la Tabla 3.1, donde se puede observar un mayor valor medio de \bar{M}_n para los copolímeros VP-co-VPcpx que para los homopolímeros VPcpx, excepto para los del

sistema VPcpz-Boc. Los valores de índices de dispersidad obtenidos se encuentran entre 1.4 and 2.0, un rango típico para polímeros lineales obtenidos por polimerización radical convencional con cierta transferencia al monómero.

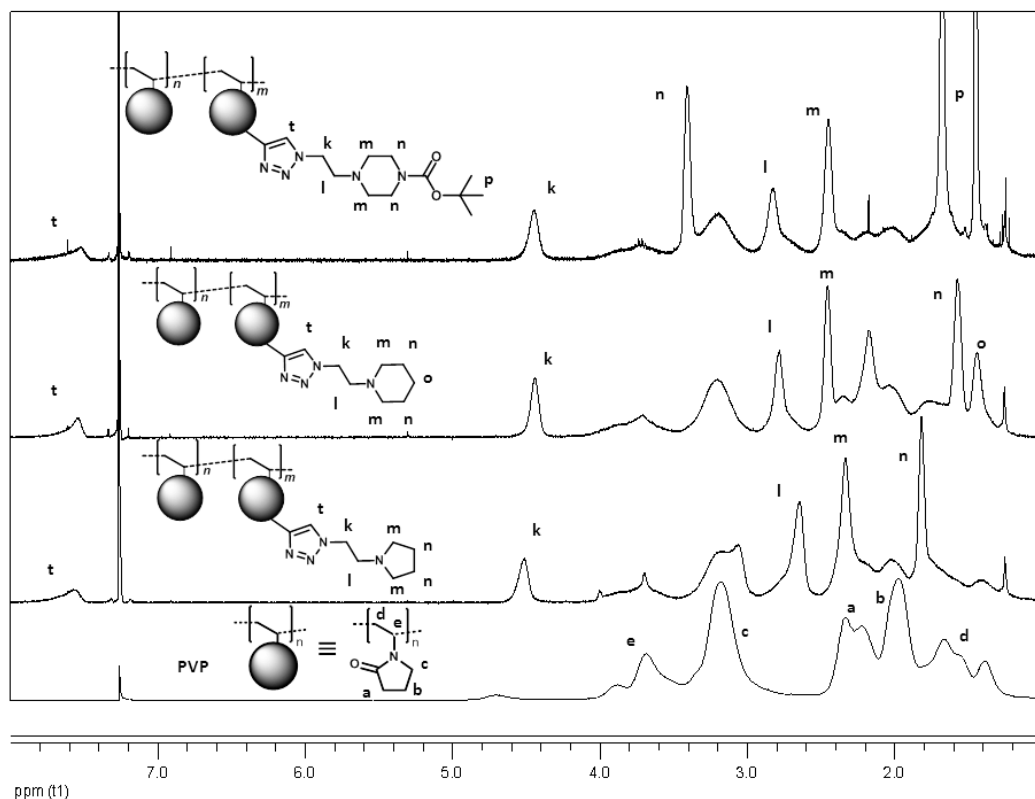


Figura 3.3: Espectros de ^1H RMN de los copolímeros con un $F_{\text{VPcpz}} = 0.4$, incluyendo el espectro de PVP como referencia.

Los valores de las Tgs de los polímeros preparados se incluyen en la Tabla 3.1. Los valores de Tg de copolímeros estadísticos y polímeros miscibles son normalmente predichos usando la ecuación de Fox:

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_1}{T_{g1}} + \frac{w_2}{T_{g2}} \quad (\text{ec. 6})$$

donde Tg1 y Tg2 son las Tgs de los correspondientes homopolímeros, y w1 y w2 son las fracciones en peso de los componentes correspondientes. El análisis de DSC de los polímeros fue llevado a cabo comparando las Tgs experimentales con las Tgs teóricas calculadas por la ecuación de Fox considerando VP como componente 1 (siendo la Tg del homopolímero PVP 170 °C) y el monómero VP-aminado como componente 2 (siendo las Tgs de los homopolímeros poli-VPcpl, poli-VPcpp y poli-VPcpp-Boc 72, 77 y 101 °C respectivamente). La Tg obtenida para todos los copolímeros en cada serie de PVP aminada disminuye linealmente cuando aumenta la cantidad del componente aminado. Los valores experimentales se ajustan adecuadamente a la ecuación de Fox. A modo de

ejemplo, se representa en la Figura 3.5 la dependencia lineal de la inversa de las Tgs obtenidas experimentalmente por DSC para los polímeros poli-(VP-co-VPcpl) en función de la fracción en peso de VPcpl en el copolímero. Todos los valores de las Tgs de los polímeros obtenidos, así como el análisis de la dependencia de las Tg con fracción en peso de los diferentes componentes, se encuentran en el Anexo 3 (Sección 3.5). En el caso de los copolímeros poli-(VP-co-VPcpz) hay una pequeña desviación en la región rica en VP, la cual puede estar relacionada con interacciones entre VP y VPcpz que hacen necesario un mayor aporte energético para alcanzar la movilidad de los segmentos y superar la Tg.

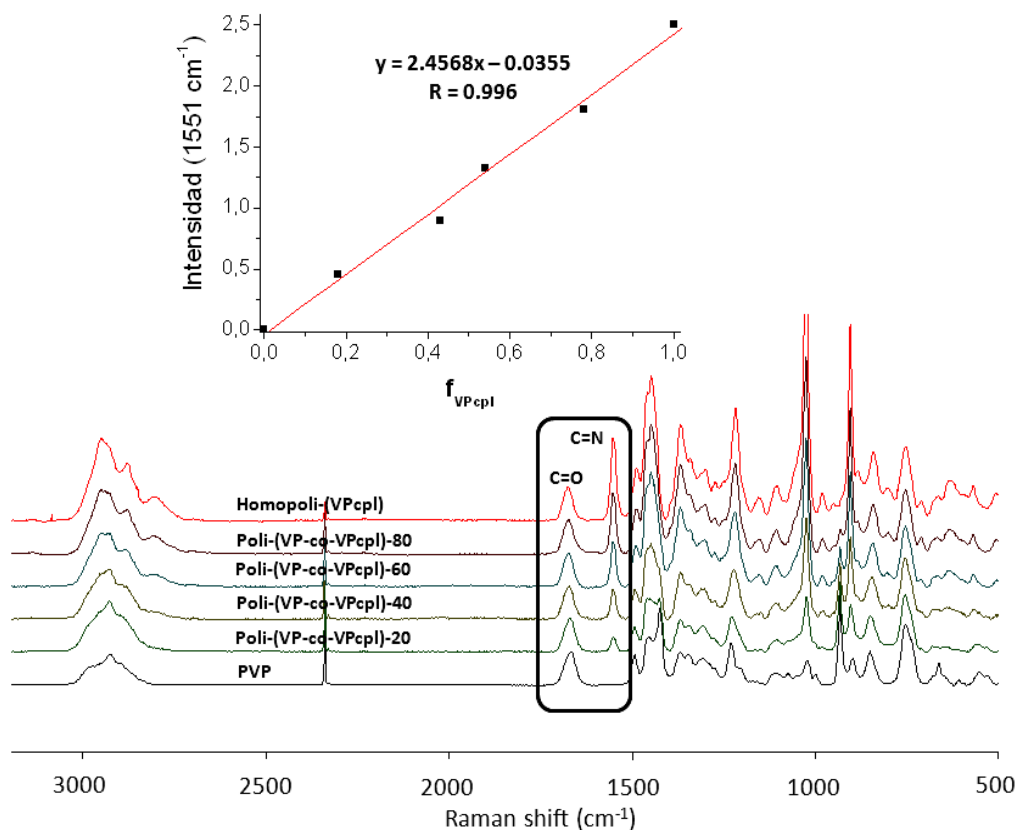


Figura 3.4: Espectros de Raman de los polímeros poli-(VP-co-VPcpl) obtenidos (abajo) y la relación entre la intensidad de señal a 1551 cm⁻¹ (enlace C=N del grupo triazol) en función del grado de funcionalización del polímero (f_{VPcpl}) (arriba).

3.2. Comportamiento dual estímulo-respuesta de los polímeros sintetizados frente a variaciones de temperatura y pH

Las PVPs aminadas mostraron sensibilidad al pH debido a la presencia de aminas secundarias y terciarias en su estructura, exhibiendo regiones tamponantes de 7.0-9.2 para los polímeros de VPcpl, 7.5-8.5 para los de VPcpl y regiones tampón anchas superiores a 8.0 para los de VPcpz (Figura 3.6).

El rango de las regiones tamponantes de los polímeros depende claramente de la naturaleza de los grupos amina, del llamado “efecto polielectrolítico”,^{25, 26} y del grado de funcionalización del polímero. Cuanto mayor sea el contenido en grupos amina, más ancha será la región tampón debido a un aumento de las interacciones existentes entre estos grupos. Debido al efecto polielectrolítico, el valor de los pKas de las aminas variará dependiendo del número de grupos que estén desionizados, ya que aumentarán las interacciones inter- e intracatenarias y el proceso de desionización de las aminas restantes será más difícil, generando así una región tamponante más ancha. Los polímeros portadores de grupos piperazina desprotegida mostraron unos rangos de pKa más anchos que los polímeros portadores de grupos pirrolidina y piperidina, debido a la presencia de una amina secundaria en su estructura, además de una amina terciaria. Este amplio rango puede ser de gran interés en aplicaciones como la terapia génica y el uso de estos polímeros como vectores no virales, ya que podrían participar de forma efectiva en el llamado “efecto de esponja de protones”,²⁷ muy importante en la etapa de liberación de ADN en el citoplasma celular.

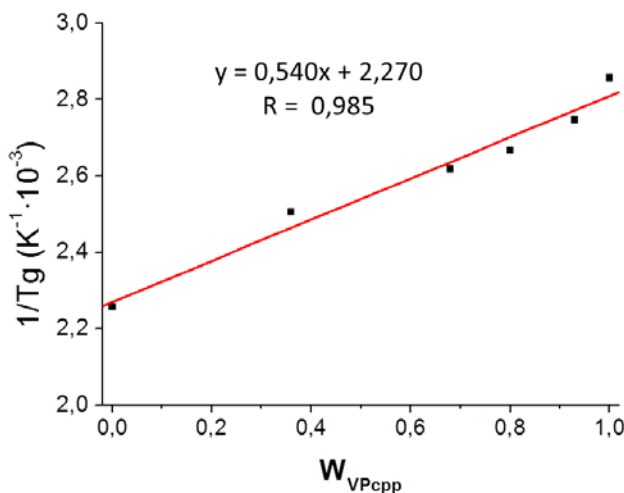


Figura 3.5: Representación gráfica de la inversa de la Tg experimental para los polímeros obtenidos de VP y VPcPP a diferentes fracciones en peso de VPcPP.

Los polímeros con pirrolidina o piperidina mostraron un “punto de nube” durante la valoración ácido-base (llevada a cabo a temperatura ambiente), es decir, la solución se enturbió en un momento dado. Este hecho, una transición de fase en la disolución de los polímeros inducida por la temperatura, debe de ser asociado al fenómeno tipo LCST que también presentan otras aminas similares, como ya comentamos al principio de este capítulo. Para estudiarlo en mayor profundidad, se llevó a cabo un completo estudio de termosensibilidad por ensayo de turbidimetría en disoluciones a diferentes pH como se describió en el apartado Experimental. La Figura 3.7 recoge todos los valores de LCST encontrados.

Tabla 1: Caracterización de los polímeros sintetizados.

Poli-(VP-co-VPcpl)					
F_{VPcpl}	f_{VPcpl}^a	\bar{M}_n (kDa)^b	Đ^b	Región tamponante^c	Tg (°C)^d
0.2	0.18	46.2	1.54	8.8 - 8.9	125
0.4	0.43	46.4	1.65	8.3 - 9.2	105
0.6	0.54	44.0	1.75	7.7 - 9.2	89
0.8	0.78	41.9	1.78	7.5 - 9.1	83
1.0	1.00	33.4	1.72	7.0 - 9.0	72

Poli-(VP-co-VPcpp)					
F_{VPcpp}	f_{VPcpp}^a	\bar{M}_n (kDa)^b	Đ^b	Región tamponante^c	Tg (°C)^d
0.20	0.17	42.9	1.46	8.7 - 8.8	126
0.40	0.44	39.2	1.44	8.0 - 8.8	109
0.60	0.60	36.7	1.49	8.0 - 8.7	102
0.80	0.83	28.2	1.52	7.7 - 8.5	91
1.00	1.00	23.2	1.51	7.5 - 8.5	77

Poli-(VP-co-VPcpz-Boc)					
F_{VPcpz-Boc}	f_{VPcpz-Boc}^a	\bar{M}_n (kDa)^b	Đ^b	Región tamponante^{c*}	Tg (°C)^{d*}
0.20	0.19	41.9	2.10	> 9.0	157
0.40	0.36	42.3	2.15	> 8.0	145
0.60	0.58	45.7	1.94	> 8.0	125
0.80	0.78	48.3	1.82	> 8.0	112
1.00	1.00	63.3	1.49	> 8.0	105

^aCalculado por ¹H RMN. ^bDeterminado por GPC en DMF con LiBr 1% peso. ^cDeterminado mediante valoración ácido-base con NaOH 0.1 M. ^dDeterminado por DSC (Tg PVP: 170 °C). (*Análisis llevado a cabo a los polímeros con el grupo piperazina desprotegida poli-(VP-co-VPcpz)).

Los polímeros sintetizados portadores de grupos piperazina no mostraron ninguna termosensibilidad observable en ninguna de las condiciones estudiadas. Este comportamiento puede ser debido a la presencia de una amina secundaria adicional, la cual cambia el balance total de hidrofobia/hidrofilia del material, haciéndole totalmente soluble en las regiones antes mencionadas.

Los copolímeros y homopolímeros sintetizados a partir de los monómeros VPcpl y VPcpp mostraron valores de LCST a pH de 7 o superiores. Por debajo de esta temperatura crítica, los polímeros son solubles. Por encima, las interacciones inter- o intramacromoleculares dominan y se produce una separación de fases. Para cada sistema, la termosensibilidad claramente depende de la composición del copolímero y del pH (Figura 3.7).

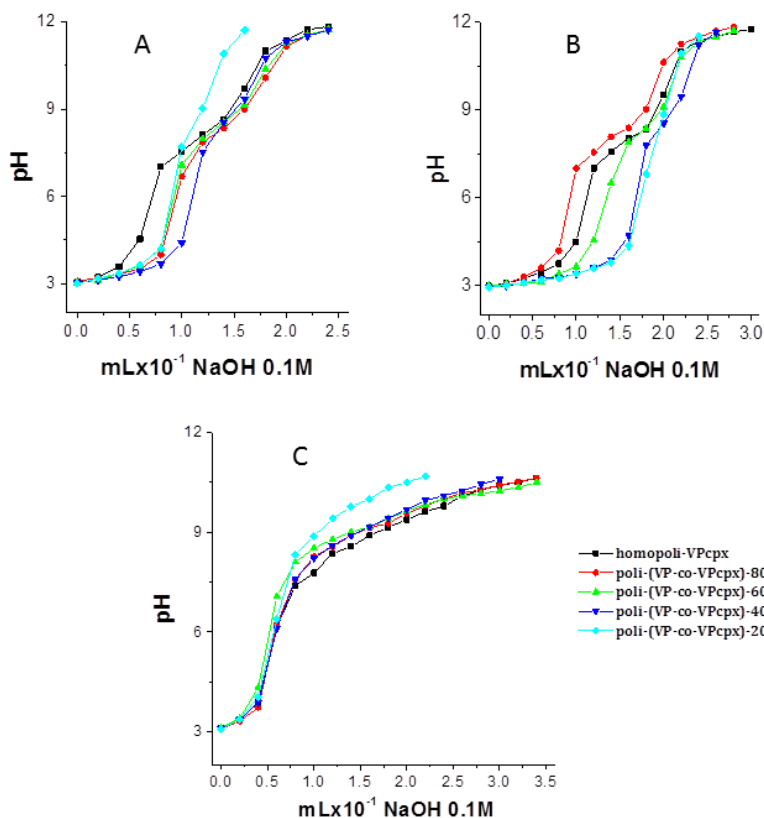


Figura 3.6: Curvas de valoración ácido-base de los copolímeros y homopolímero obtenidos a partir de los monómeros VP y VPcpx: VPcpl (A), VPcpp (B) y VPcpz (C), sintetizados con diferente grado de aminación.

Los diferentes valores de LCST se pueden analizar en función de la composición y/o el pH. Por un lado, para disoluciones de polímero a un pH dado, cuanto mayor es el contenido de VP nativa (la cual es más hidrofílica que las aminas modificadas no protonadas) mayor es la LCST. Una dependencia composicional similar ha sido descrita para sistemas cuyas unidades termosensibles fueron copolimerizadas con unidades hidrofílicas.^{1, 16-20} Se debe destacar que esta dependencia no es

lineal. Cuanto mayor es el contenido en aminas, la variación de LCST es menor. Este comportamiento puede ser debido, hasta cierto punto, a la heterogeneidad composicional de las cadenas. Asumiendo unas reactividades de VP y de los derivados de VP similar a la descrita en el Capítulo 2 para VP y VPPhta, la heterogeneidad composicional de la copolimerización aumenta con la fracción molar nominal de monómero derivatizado (Figura 2.3 del Capítulo 2). Si hay una colección heterogénea de cadenas, la turbidimetría puede estar relacionada con las cadenas más ricas en amina ya que estas tienen menor LCST y menor punto de nube. Este hecho podría explicar la forma no lineal de las tendencias de la Figura 3.7, ya que los valores de los sistemas más cargados en amina podrían no ser representativos de todo el sistema, sino solo de las cadenas más ricas en amina y con valores de LCST menores que el promedio.

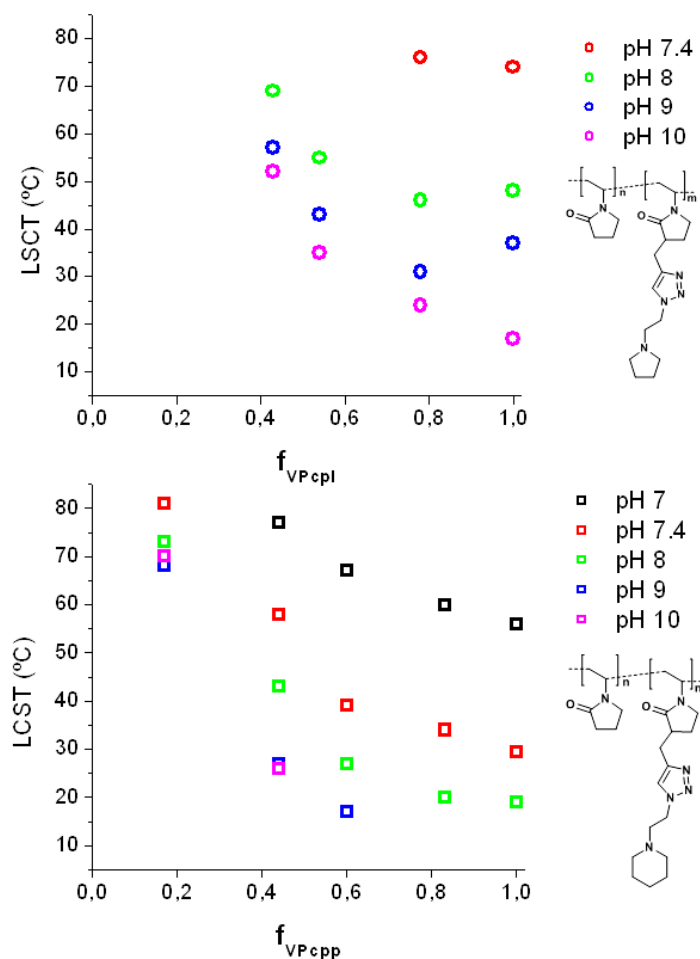


Figura 3.7: Valores de LCST para poli-(VP-co-VPcpl) (arriba) y poli-(VP-co-VPcpp) (abajo) en función del grado de funcionalización en los polímeros a diferentes valores de pH (valores de LCST estimados a una transmitancia de 50%).

Por otro lado, para una composición dada, cuanto mayor es el pH de la disolución, menor es el valor de la LCST. Este comportamiento también se ha encontrado en sistemas similares con aminas terciarias²⁸ y está relacionada con la protonación de las aminas, la cual incrementa la hidrofilia y dificulta las interacciones entre cadenas polímero-polímero responsables de la separación de fases. Una selección de gráficos turbidimétricos se representan en la Figura 3.8, donde se muestra la dependencia de la composición y el pH: los gráficos de la parte superior muestran la transmitancia de las disoluciones de los polímeros con diferente grado de aminación a un pH seleccionado (pH 8), mientras que los gráficos de la parte inferior muestran la influencia del pH para un copolímero con una composición dada ($F_{VPcp} = 0.8$).

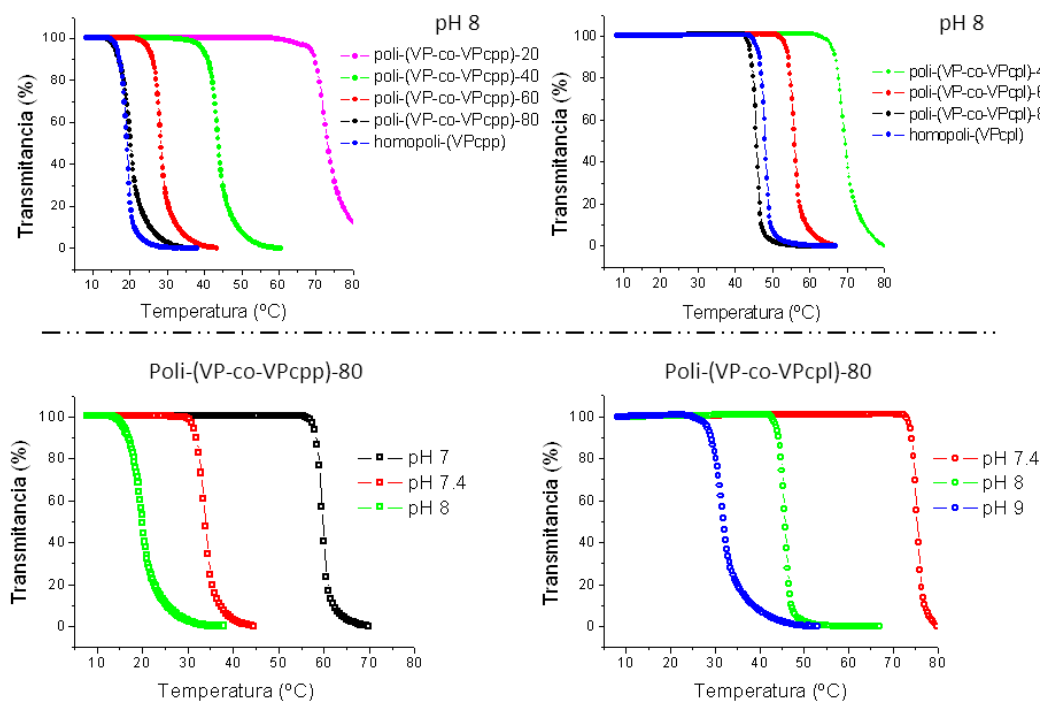


Figura 3.8: Respuesta térmica de los polímeros portadores de VPcpl (derecha) y VPcpl (izquierda) a pH 8 (arriba), y para los copolímeros poli-(VP-co-VPcpl)-80 (derecha) y poli-(VP-co-VPcpl)-80 (izquierda) a diferentes valores de pH (abajo).

Cuando se comparan ambos sistemas de copolímeros, hay algunas diferencias importantes. Los copolímeros portadores de grupos piperidina poli-(VP-co-VPcpl) muestran para cada valor de pH menores valores de LCST que aquellos sistemas portadores de grupos pirrolidina poli-(VP-co-VPcpl). Este comportamiento está en concordancia con la mayor hidrofobia del ciclo de piperidina, el cual tiene un grupo metileno más en su estructura. Además, los valores de LCST de los sistemas de VPcpl no cambian cuando se incrementa el pH de 9 a 10, lo cual podría ser debido a que el sistema de piperidina está totalmente desprotonado a pH 9, teniendo las mismas interacciones polímero-polímero a ambos pHs. Por otra parte, el copolímero poli-(VP-co-VPcpl)-20 exhibe termosensibilidad mientras que poli-(VP-co-VPcpl)-20 no, lo cual es hasta cierto punto sorprendente

ya que hay muy pocas unidades termosensibles en las cadenas. Este comportamiento sugiere, para el sistema de VPcpp, una participación de la estructura anfifílica de la VP en las interacciones entre cadenas poliméricas responsables de la separación de fases.

4. Conclusiones

Se han obtenido polímeros derivados de PVP con sensibilidad a la temperatura y/o al pH mediante la copolimerización del monomero VP con monómeros de VP funcionalizados con diferentes aminas terciarias cíclicas: pirrolidina, piperidina y piperazina (la última incluye una amina secundaria en su estructura). Los polímeros derivados de piperazina mostraron una región tamponante bastante amplia y nula termosensibilidad, probablemente debido a la presencia de grupos de amina secundaria y a su mayor hidrofilia, mientras que los sistemas portadores de grupos pirrolidina y piperidina mostraron sensibilidad al pH y a la temperatura. Este tipo de derivados de PVP con doble sensibilidad son inéditos en la literatura.

Para los dos sistemas con sensibilidad dual se ha encontrado termosensibilidad a pH 7 o superior, esto es en las proximidades del pKa donde los grupos aminas comienzan a estar en su forma neutra y pueden participar más fácilmente en las interacciones entre cadenas polímero-polímero, y en la consecuente separación de fases. Debido a esta influencia del pH en la protonación, los valores de LCST disminuyen al incrementar el pH de la disolución. Además, la termosensibilidad depende también de la composición del copolímero: al aumentar el contenido en VP nativa se incrementa el valor de las LCST del material. Para un valor dado de pH, el valor de la LCST podría ser ajustado mediante una adecuada selección de la naturaleza del grupo amina así como de su cantidad en la cadena polimérica. La termosensibilidad exhibida por los copolímeros de sólo un 20% molar de piperidina es remarcable, y podría indicar una participación de las unidades de VP en el fenómeno de la separación de fases debido a su naturaleza anfifílica. Además, en el Capítulo 4 también se analiza el posible uso de los polímeros obtenidos en este capítulo como agentes no virales de transfección en terapia génica.

* Parte de este trabajo se encuentra publicado en A. del Prado, R. Navarro, P. Levkin, A. Gallardo, C. Elvira, H. Reinecke. 'Dual stimuli-responsive polyamines derived from modified N-vinylpyrrolidones through CuAAC Click Chemistry' *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2015**. DOI: 10.1002/pola.27949

5. Bibliografía

1. A. Schmalz, M. Hanisch, H. Schmalz and A. H. Müller, *Polymer*, 2010, **51**, 1213-1217.
2. S. Guo, Y. Qiao, W. Wang, H. He, L. Deng, J. Xing, J. Xu, X.-J. Liang and A. Dong, *Journal of Materials Chemistry*, 2010, **20**, 6935-6941.

3. N. González, C. Elvira and J. S. Román, *Macromolecules*, 2005, **38**, 9298-9303.
4. S. Liu, J. V. Weaver, Y. Tang, N. C. Billingham, S. P. Armes and K. Tribe, *Macromolecules*, 2002, **35**, 6121-6131.
5. Y. Shen, X. Ma, B. Zhang, Z. Zhou, Q. Sun, E. Jin, M. Sui, J. Tang, J. Wang and M. Fan, *Chemistry-A European Journal*, 2011, **17**, 5319-5326.
6. A. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu and S. Kankane, *Progress in Polymer Science*, 2008, **33**, 1088-1118.
7. J. Hu and S. Liu, *Macromolecules*, 2010, **43**, 8315-8330.
8. J. F. Mano, *Advanced Engineering Materials*, 2008, **10**, 515-527.
9. R. Yoshida, K. Sakai, T. Okano and Y. Sakurai, *Industrial & engineering chemistry research*, 1992, **31**, 2339-2345.
10. M. Miyajima, M. Yoshida, H. Sato, H. Omichi, R. Katakai and W. I. Higuchi, *European polymer journal*, 1994, **30**, 827-831.
11. A. Matsumoto, T. Kurata, D. Shiino and K. Kataoka, *Macromolecules*, 2004, **37**, 1502-1510.
12. S. Aerry, A. De, A. Kumar, A. Saxena, D. Majumdar and S. Mozumdar, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, **101**, 2015-2026.
13. T. Yakushiji, K. Sakai, A. Kikuchi, T. Aoyagi, Y. Sakurai and T. Okano, *Analytical Chemistry*, 1999, **71**, 1125-1130.
14. H. Feil, Y. H. Bae, J. Feijen and S. W. Kim, *Journal of Membrane Science*, 1991, **64**, 283-294.
15. X.-J. Ju, S.-B. Zhang, M.-Y. Zhou, R. Xie, L. Yang and L.-Y. Chu, *Journal of hazardous materials*, 2009, **167**, 114-118.
16. S. Liu and M. Liu, *Journal of applied polymer science*, 2003, **90**, 3563-3568.
17. T. Motonaga and M. Shibayama, *Polymer*, 2001, **42**, 8925-8934.
18. Y. Zhang and A. L. Yarin, *Journal of Materials Chemistry*, 2009, **19**, 4732-4739.
19. V. P. Gilcreest, W. M. Carroll, Y. A. Rochev, I. Blute, K. A. Dawson and A. V. Gorelov, *Langmuir*, 2004, **20**, 10138-10145.
20. T. Uemukai and M. Ishifune, *Journal of Applied Polymer Science*, 2013, **129**, 2554-2560.
21. A. A. A. de Queiroz, A. Gallardo and J. San Román, *Biomaterials*, 2000, **21**, 1631-1643.
22. C. Jumeaux, R. Chapman, R. Chandrawati and M. M. Stevens, *Polymer Chemistry*, 2015, **6**, 4116-4122.
23. N. Yan, J. Zhang, Y. Yuan, G.-T. Chen, P. J. Dyson, Z.-C. Li and Y. Kou, *Chemical Communications*, 2010, **46**, 1631-1633.

24. F. T. Reyes and M. A. Kelland, *Energy & Fuels*, 2013, **27**, 3730-3735.
25. A. Fernandes, R. Martins, C. da Trindade Neto, M. Pereira and J. Fonseca, *Journal of applied polymer science*, 2003, **89**, 191-196.
26. S. V. Kazakov, V. I. Muronetz, M. B. Dainiak, V. A. Izumrudov, I. Y. Galaev and B. Mattiasson, *Macromolecular Bioscience*, 2001, **1**, 157-163.
27. R. Kircheis, L. Wightman and E. Wagner, *Advanced drug delivery reviews*, 2001, **53**, 341-358.
28. J. A. Redondo, R. Navarro, E. Martínez-Campos, M. Pérez-Perrino, R. París, J. L. López-Lacomba, C. Elvira, H. Reinecke and A. Gallardo, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2014, **52**, 2297-2305.

CAPÍTULO 4
EVALUACIÓN DE LOS POLÍMEROS DE PVP
AMINADOS COMO AGENTES NO VIRALES DE
TRANSFECCIÓN

CAPÍTULO 4: EVALUACIÓN DE LOS POLÍMEROS DE PVP AMINADOS COMO AGENTES NO VIRALES DE TRANSFECCIÓN

1. Introducción

1.1. La terapia génica

La terapia génica es un procedimiento mediante el cual se realiza un tratamiento a células pertenecientes a un órgano o un tejido introduciendo material genético funcional en su núcleo, integrando nueva información genética en el genoma o como un episoma externo o plásmido. La introducción de dichos genes permite la codificación de una proteína terapéutica, la cual induce la recuperación del tejido u órgano afectado. En un principio, la terapia génica se utilizó para la sustitución de determinados genes mutados por copias normales en células dañadas, pero debido a los grandes avances y logros conseguidos se utiliza hoy en día para tratar y prevenir enfermedades. Por ello, es un método efectivo que se utiliza para reemplazar aquellos genes alterados que ocasionan una enfermedad, inhibir o contrarrestar los efectos dañinos propios de la alteración genética, o introducir nuevos genes que ayuden a la lucha contra una enfermedad. La hemofilia, la fibrosis quística, algunos tipo de cáncer o el VIH son ejemplos de enfermedades crónicas y desórdenes genéticos para los que actualmente se investiga su tratamiento con terapia génica.¹

En este proceso, se necesitan dos componentes esenciales: 1- el material genético funcional que sea expresado en una célula diana, y 2- un sistema de transporte y liberación de dicho material, denominado “vector”. Existen dos clases bien diferenciadas de vectores: los vectores virales, que corresponden a virus como transportadores del material genético, y los vectores no virales, basándose en compuestos sintéticos mayormente catiónicos, destacando principalmente lípidos, péptidos y polímeros. En esta tesis nos centraremos en los vectores no virales basados en polímeros.

Los vectores virales derivan, como su propio nombre indica, de virus (como los adenovirus o retrovirus) con una previa eliminación de los genes patógenos e inserción del material funcional. Es un sistema de transporte muy potente y efectivo debido a que tras millones de años de evolución han desarrollado una maquinaria específica para lograr llegar a las células diana y liberar el material genético. Sin embargo, debido a su naturaleza, ha habido muchos casos de respuesta inmunitaria frente al vector viral, llegando a producir grandes enfermedades como la leucemia, e incluso la muerte.^{2, 3} Además, una de las limitaciones de estos vectores más importantes a destacar es la mutagénesis insercional, donde el material genético huésped se inserta de manera aleatoria en el genoma del individuo, alterando la expresión normal de algún gen.

En las últimas décadas, debido a los obstáculos surgidos en las investigaciones con vectores virales, se comenzaron a investigar los vectores no virales, los cuales ofrecían características muy interesantes, como una baja inmunogenicidad, bajo coste de producción, alta bioseguridad y reproducibilidad. Sin embargo, los sistemas desarrollados hasta ahora de vectores no virales no tienen la eficacia que tenían los vectores virales, siendo esta meta todavía un gran reto a lograr.

1.2. Polímeros como vectores no virales

Entre los diferentes tipos de vectores no virales, los polímeros presentan una gran versatilidad a la hora de su preparación, ya que mediante un diseño previo de la estructura, morfología y funcionalización se pueden preparar sistemas transportadores prácticamente a medida. Los polímeros portadores de grupos cationizables (o catiónicos) forman complejos polielectrolíticos con los ácidos nucleicos (que presentan carga negativa neta), formando unas entidades polímero-material genético denominados poliplejos (*polyplexes*). La mayor parte de los polímeros utilizados como vectores no virales llevan anclados grupos amina alifáticas primarias, secundarias o terciarias, las cuales están en mayor o menor medida protonadas en condiciones fisiológicas. Los *polyplexes* formados pueden condensar el ADN dando lugar a pequeñas partículas (del orden de decenas o cientos de nanómetros) compatibles con la internalización celular, proporcionando además una protección estérica al material genético frente a la posible acción de enzimas presentes en el medio celular, como las nucleasas.

Estos *polyplexes*, una vez introducidos en el cuerpo del paciente, deben recorrer un camino lleno de obstáculos hasta llegar a la célula diana, pudiendo interaccionar con componentes sanguíneos o con otras proteínas. Además, el tamaño de estas partículas es muy importante a la hora de su internalización celular mediante endocitosis, ya que se ha comprobado que algunos tipos celulares sólo son capaces de endocitar partículas de un tamaño comprendido entre 50-200 nm.⁴⁻⁹ Por ello, se caracterizarán los *polyplexes* formados por el polímero y el material genético utilizados en este trabajo, obtenidos a diferentes proporciones polímero-ADN, denominados como relación N/P (refiriéndose N al grupo amino del polímero y P al grupo fosfato de las bases nitrogenadas del ADN).

Una vez que estos complejos llegan a la célula diana, son internalizados mediante endocitosis, generándose una vesícula endosomal o endosoma en el medio citoplasmático (Figura 4.1).¹⁰ En la maduración del endosoma, las ATPasas bombean protones al interior de éste para la degradación del material fagocitado. Sin embargo, los polímeros, al tener grupos amina en su estructura con capacidad tamponante, interaccionan con ellos y se ionizan, sin aumentar mucho el pH del medio. Debido al aumento de iones positivos en el medio, las bombas transmembrana regulan la carga con iones cloruro (Cl⁻), aumentando la concentración de iones en el endosoma, lo que causa un incremento extremo en la presión osmótica del endosoma, produciéndose finalmente su ruptura, quedando el polímero y el ADN libres en el citoplasma. A este efecto de ‘atrapamiento’ de protones por parte del polímero se denomina “efecto esponja de protones”,¹¹ mecanismo mediante el cual se explica la mayor o menor eficacia de transfección. Debido a esto, el diseño del polímero, así como las características del complejo son vitales para el éxito del proceso de transfección. Una vez libre, el ADN debe poder desplazarse hasta llegar al núcleo, donde finalmente se expresa el gen terapéutico, obteniéndose la proteína correspondiente. Es necesario tener en cuenta que de la mayoría de los vectores poliméricos usados hoy día, sólo una pequeña fracción de la dosis aplicada llega a expresarse satisfactoriamente,^{4, 12, 13} por lo que sigue existiendo un enorme esfuerzo para conseguir sistemas más eficientes y con niveles de transfección/toxicidad óptimos.

La naturaleza de las aminos portadoras por los polímeros juega un papel esencial a la hora de complejar el material genético, así como el transporte y liberación del mismo. Por ello, existen numerosos estudios basados en el diseño de polímeros aminados para este fin. En la Figura 4.2 se representan las estructuras de los polímeros más representativos de este campo, donde materiales como poli-L-lisina (PLL),^{14, 15} poli-(ácido α -(4-aminobutil)-L-glicólico) (PAGA),¹⁶ poli-etilenimina (PEI),^{11, 17, 18} poli-fosfoésteres (PPE),¹⁹ poli-amidoamina (PAMAM)²⁰ o el quitosano^{21, 22} son los más empleados hasta el momento en este campo de investigación, así como innumerables derivados de ellos.

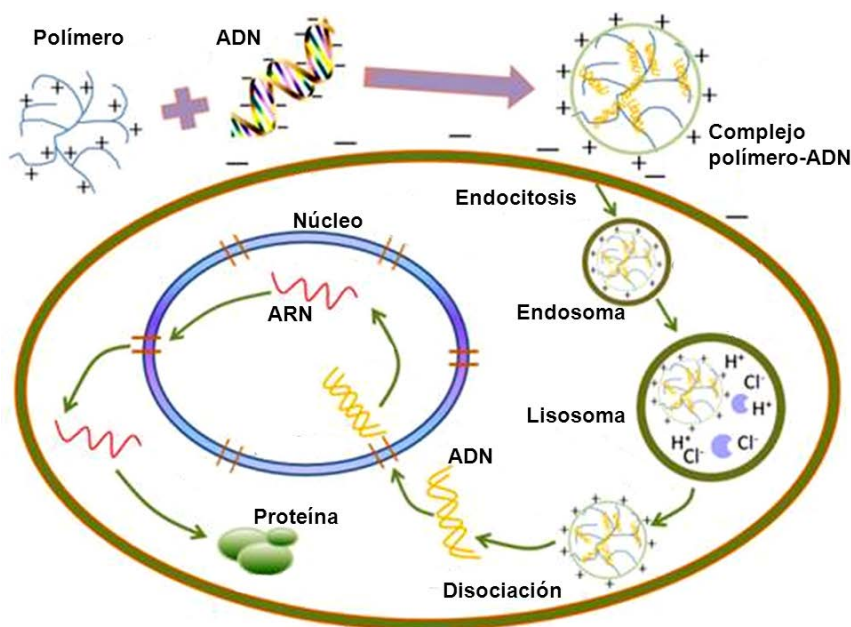


Figura 4.1: Esquema representativo del proceso de transfección a nivel celular a partir de un complejo polímero-ADN (*polyplex*). (Imagen modificada de L. Jin y col. *Theranostics*, **2014**, 4, 240-255).

El pKa de las aminos alifáticas depende de la naturaleza de las mismas, siendo menor cuanto menor sea la sustitución de las mismas. Así, el pKa de las aminos primarias será menor que el de las aminos secundarias, y el de éstas, menor al de las aminos terciarias. Por ello, a un pH fisiológico cercano a 7, las aminos primarias estarán parcialmente protonadas, mientras que las aminos terciarias lo estarán casi en su totalidad. Sin embargo, al estar ancladas a un polímero, el pKa de las aminos varía por el denominado efecto polielectrolito comentado en el Capítulo 3. Este pKa influye en la densidad de carga de la macromolécula, facilitando así la interacción con los grupos fosfato del material genético siendo grupos muy efectivos en la complejación. La mayor densidad de carga también se relaciona con una mayor toxicidad mediante la hipótesis de que estos transportadores catiónicos interaccionan con dominios aniónicos en la superficie celular generando agregados y su consecuente aumento de tamaño, siendo la célula incapaz de internalizar estas partículas. Por otra parte, la existencia de una protonación parcial de las aminos daría una densidad de carga menor,

quedando parcialmente desionizadas. De cualquier modo, aunque la efectividad a la hora de complejar en este caso sea menor, existirían grupos amina capaces de interactuar con los protones generados en la maduración del endosoma, siendo favorable su presencia para participar en el efecto antes mencionado “esponja de protones” para la liberación del material genético en el citosol.

No sólo se ha estudiado durante años la eficacia de estos polímeros aminados en su forma nativa, sino también la posibilidad de mejorar los resultados obtenidos modificando su estructura. El ejemplo más común es el de la PEI ramificada, cuya tasa de transfección es muy superior a la mayoría de los demás polímeros catiónicos, aunque la gran densidad de aminas en su estructura le proporciona una alta toxicidad. Por ello, se han llevado a cabo estudios de funcionalización de la PEI ramificada con grupos que aumente su biocompatibilidad, como por ejemplo con cadenas de poli-etilenglicol (PEG).^{23, 24} El efecto contrario ocurre con la PLL, el cual tiene una toxicidad no muy elevada, pero los índices de transfección son bajos. Algunos estudios han intentado aumentar su efectividad mediante la modificación del polímero introduciendo aminas secundarias y terciarias para mejorar su capacidad tamponante,²⁵ mejorando así sus propiedades a la hora de liberar el material genético en el citoplasma. Además, entidades más complejas como las ciclodextrinas (oligómeros cíclicos de glucosa con carácter anfifílico debido a presencia en su estructura de una cavidad hidrófoba) han sido ancladas a diferentes polímeros para aumentar su capacidad complejante del material genético.^{26, 27}

1.3 PVP como soporte de vectores aminados

En esta tesis se han obtenido polímeros basados en PVP portadores de aminas primarias, secundarias y terciarias (Figura 4.3) para el estudio de su efectividad como agentes complejantes de ADN, así como su evaluación *in vitro* como agentes no virales de transfección, buscando la composición óptima entre el balance de grupos amino en su estructura que favorezca la complejación, transporte y liberación de ADN, así como la presencia de VP nativa en la cadena macromolecular, que aumente la biocompatibilidad del material sintetizado.

Los polímeros de PVP aminados son particularmente interesantes debido por un lado a la existencia de los grupos amina, que favorecen la interacción polímero-ADN, así como por la estructura nativa de PVP, como polímero no tóxico y soluble en agua. Ciertos trabajos han mostrado el efecto de combinar aminas con PVP en diferentes sistemas poliméricos, mostrando buenos resultados como excipiente en la administración de material genético²⁸ o como vector no viral de transfección, por ejemplo por inyección intramuscular para la supresión de neovascularización,²⁹ o en la liberación de genes angiogénicos para la supresión de metástasis celular.³⁰ También en este campo, PVP se ha unido a otros componentes cationizables activos con el fin de modular la toxicidad del polímero, dando como resultado copolímeros de injerto con PEI,³¹ y con metacrilato de dimetilaminoetilo (DMAEMA).³² Por lo tanto, la preparación de nuevos derivados de PVP portadores de aminas podría ser visto como un diseño simplificado para esta aplicación concreta, ya que es un sistema polimérico que combina en un esqueleto común de PVP, su nula toxicidad, una excelente biocompatibilidad e hidrofilia, con la capacidad de complejación de los grupos amino

cationizables. Además, se ha de señalar que la aproximación “*bottom-up*” basada en la relación de monómeros que se utiliza para la síntesis de estos polímeros tiene una gran flexibilidad para controlar la cantidad de amina presente en los sistemas (ajustando la relación de comonómero en la alimentación).

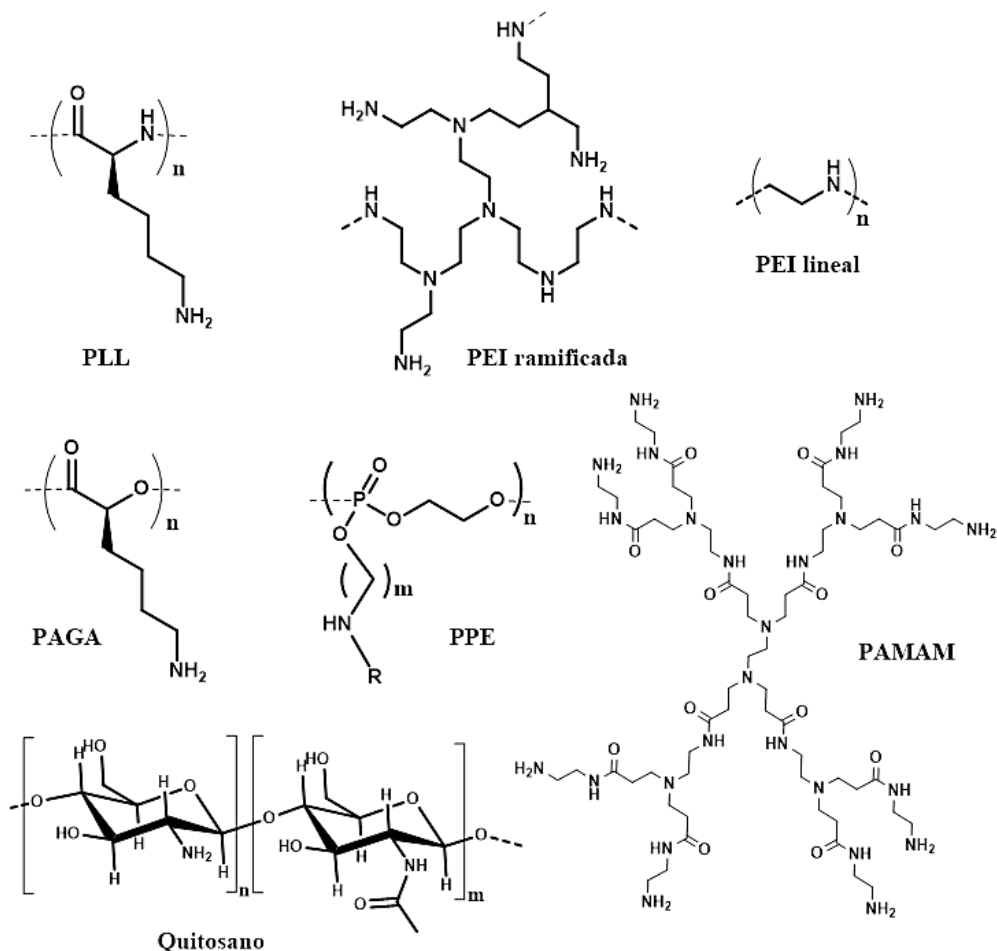


Figura 4.2: Estructura de diferentes polímeros utilizados habitualmente en estudios de transfección, tanto como control positivo como también para su derivatización para mejorar sus propiedades, como la biocompatibilidad, eficiencia en complejación y liberación del material genético.

Hay que señalar que los polímeros de PVP portadores de grupos amina primaria, cuya síntesis y caracterización están descritas en el Capítulo 2, se evaluaron en el *Network of Excellence of Functional Biomaterials (NFB)*, perteneciente a la Universidad Nacional de Irlanda (Galway), siguiendo el protocolo utilizado por el grupo de Dr. Abhay Pandit y Dr. Wenxin Wan. Los polímeros de PVP portadores de grupos amina secundaria y terciaria, cuya síntesis y caracterización están descritas en el Capítulo 3, se evaluaron en el Grupo de Ingeniería de Tejidos, del Instituto de Estudios Biofuncionales (IEB) de la Universidad Complutense de Madrid, siguiendo el protocolo

utilizado por el grupo de Prof. Jose Luis López Lacomba y Dra. Viviana Ramos, en colaboración con el grupo de Dr. Pavel Levkin, del Departamento de Toxicología y Genética, del *Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*, en Karlsruhe (Alemania). Aunque ambos protocolos son muy similares, presentan ciertas diferencias tal y como se detalla en el inicio del apartado de Resultados y Discusión.

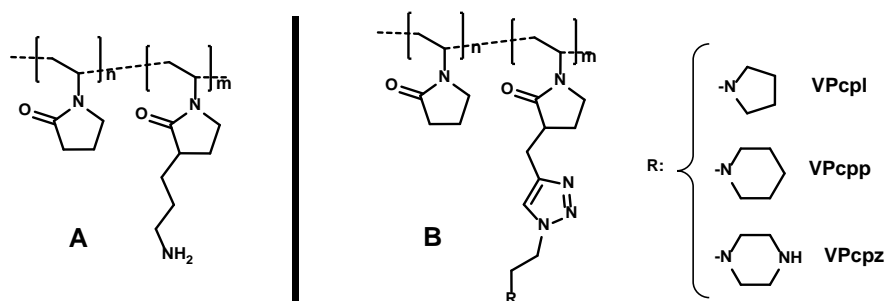


Figura 4.3: Estructuras de los polímeros sintetizados de PVP portadores de grupos amina primaria (A) y grupos aminas secundarias y terciarias (B).

2. Experimental

2.1. Reactivos

La N-vinil-2-pirrolidona (VP) de Sigma-Aldrich se destiló a presión reducida y se conservó a 4°C. El azobisisobutironitrilo (AIBN) de Sigma-Aldrich se recrystalizó en etanol. Los disolventes se emplearon sin purificación previa. El resto de monómeros fueron obtenidos previamente como se describe en el Capítulo 1.

Como material genético se empleó el plásmido pCMV-GLuc (*New England Biolabs*), de aproximadamente 6000 pares de bases (pb) de longitud, que codifica el gen de la luciferasa del copépodo *Gaussia princeps*, controlado por un promotor constitutivo. Este gen fue utilizado como gen marcador para evaluar la eficiencia de transfección de los polímeros de forma indirecta. Para el estudio se utilizó una línea celular de fibroblastos embrionarios Swiss 3T3 procedentes de ratón, utilizando Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de Sigma-Aldrich como medio de cultivo, con un suplemento del 10% de suero fetal bovino (FBS) de Gibco y un 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S) de Sigma-Aldrich.

El análisis de luciferasa se efectuó con el kit comercial *BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit* (*New England BioLabs*). El análisis de toxicidad de los polímeros se llevó a cabo por estudios de actividad metabólica con *AlamarBlue™* (*BioSource International, Invitrogen, Ireland*) y por estudios de viabilidad celular mediante ensayos con *Calceína AM* (*Molecular Probes*).

Como polímeros de referencia en los estudios de transfección y de toxicidad se utilizaron PLL lineal (15-30 kDa) de Sigma-Aldrich y PEI ramificada (25 kDa) de Sigma-Aldrich.

2.2. Polimerizaciones

La síntesis de los polímeros de PVP portadores de grupos amina (primarias, secundarias y terciarias) se llevaron a cabo según está descrito en el apartado ‘Polimerizaciones’ de la parte experimental del Capítulo 2 (en el caso de grupos aminas primarias (Figura 4.3-A)) y del Capítulo 3 (en el caso de grupos amina secundaria y terciaria (Figura 4.3-B)).

2.3. Métodos y equipos

2.3.1. Formación y caracterización de *polyplexes* (complejos polímero-ADN)

Los complejos polielectrolíticos polímero/ADN se prepararon a distintas relaciones polímero/ADN a temperatura ambiente y en agua destilada. Se usaron relaciones molares de carga N/P, refiriéndose N al grupo amino del polímero y P al grupo fosfato de las bases nitrogenadas del ADN.

Se prepararon complejos a diferentes relaciones N/P mediante la mezcla de disoluciones madre de 1 µg/µL de ADN y 1 µg/µL de polímero. En el caso de los polímeros portadores de amina primaria poli-(VP-co-VPNH₂), las relaciones N/P usadas van desde 1:1 hasta 30:1 mientras que en el caso de los polímeros portadores de aminas secundarias y terciarias poli-(VP-co-VPcpx), donde x es l, p o z (Figura 4.3-B), las relaciones van desde 2:1 hasta 10:1 (en este caso se decidió empezar con relaciones 2:1 debido a la baja transfección obtenida para los polímeros portadores de amina primaria). La mezcla fue mantenida a temperatura ambiente y sin agitación durante 30 minutos para permitir la formación de los complejos mediante interacción electrostática. La concentración final fue ajustada en todos los casos a 1 µg de ADN en 20 µL de agua destilada. Como sistemas de referencia en el estudio del sistema poli-(VP-co-VPNH₂) se utilizaron complejos de PLL (también portadores de amina primaria) en una relación N/P de 10:1, elegida como relación óptima en el estudio de transfección y toxicidad,³³ igual a la de los polímeros estudiados obtenidos en las mismas condiciones. Para el sistema poli-(VP-co-VPcpx) se usaron como referencias complejos de PEI (polímero portador de aminas primarias, secundarias y terciarias) a las mismas relaciones N/P que las usadas con los derivados de PVP y formados en las mismas condiciones.

Electroforesis en gel de agarosa. Utilizando un gel de agarosa al 0.9% (peso/volumen), se evaluó la migración de los *polyplexes* aplicando un voltaje de 100 V durante 30 minutos. Como patrón se utilizó el propio plásmido pCMV-GLuc sin complejar. Como medio tamponante se utilizó TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

En el caso de los complejos obtenidos a partir de poli-(VP-co-VPNH₂), se utilizó un tinte de sacarosa para el revelado posterior en el equipo de radiación UV GBOX Chemi XL, *United Kingdom* para la visualización de las bandas. En el caso de los complejos obtenidos a partir de poli-(VP-co-VPcpx), se utilizó bromuro de etidio para el revelado posterior de las bandas, añadiendo al gel 4 µL de una disolución acuosa de 10 mg/mL.

Medida del tamaño de partícula y determinación de la carga en superficie (potencial ζ). El tamaño de los complejos fue determinado mediante medidas de dispersión de luz (DLS) (NanoZS

Malvern Instruments), y su carga en superficie (potencial ζ) fue medida usando un Zetamaster system (Malvern Instruments). Los complejos fueron preparados utilizando 10 μg de plásmido y la cantidad correspondiente de polímero dependiendo de la relación N/P, con un volumen final de medida de 100 μL (para medidas de tamaño de partícula) y de 1 mL para el análisis del potencial ζ . En todos los casos, la medida fue realizada por triplicado, a 25 °C, dejando 1 minuto de equilibrado antes de cada medición. El tiempo de adquisición fue de 300-600 segundos para cada muestra.

2.3.2. Análisis de la eficiencia de transfección y de la citocompatibilidad *in vitro* de los *polyplexes*

Los ensayos de transfección se llevaron a cabo con fibroblastos Swiss 3T3, cultivados en DMEM, suplementado con un 10% de FBS y un 1% de antibiótico (P/S). Se sembraron 10000 células/pocillo para los sistemas poli-(VP-co-VPNH₂) y 5000 para los sistemas poli-(VP-co-VPcpx), en una placa de 96 pocillos, y fueron incubadas durante 24 horas, a 37 °C en atmósfera húmeda y con un 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se retiró el medio y se añadió DMEM sin suero, seguido de la cantidad correspondiente de la solución de *polyplexes* (1 μg de ADN por pocillo), incubando las células con el nuevo medio con los *polyplexes* durante 4 horas. Trascurrido ese tiempo de incubación, el medio fue retirado de cada pocillo y sustituido por medio de cultivo completo (DMEM con FBS y P/S), con el que fueron incubadas durante 24 horas más para los sistemas poli-(VP-co-VPNH₂) y 48 horas más para los sistemas poli-(VP-co-VPcpx) en las mismas condiciones. Finalmente, el medio de cultivo fue recolectado, y el ensayo fue realizado utilizando el kit comercial *BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit (New England Biolabs)* siguiendo las instrucciones del proveedor. La expresión de luciferasa fue cuantificada con un lector de placas VICTOR3 V (Multilabel Counter, Perkin Elmer BioSignal Inc.).³⁴ Todas las muestras se sembraron y midieron por triplicado.

La toxicidad de los *polyplexes* derivados del sistema poli-(VP-co-VPNH₂) se determinó mediante el análisis de la actividad metabólica (mitocondrial) de las células tras el ensayo de transfección descrito anteriormente, realizando el ensayo con el reactivo comercial *Alamar Blue (Biosource International, Invitrogen)*. Para ello, una vez transcurridas las 48 horas de incubación desde su siembra en la placa de 96 pocillos, el medio fue retirado y las células se lavaron dos veces con 100 μL de una solución salina Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) de Sigma-Aldrich. Después, se añadieron 100 μL de una solución del reactivo Alamar Blue al 10% (v/v) en HBSS a cada pocillo y se incubó durante 3 horas a 37 °C en atmósfera húmeda y con un 5% de CO₂. Trascurrido ese tiempo, la fluorescencia de cada muestra fue medida a 550 nm y 595 nm usando un lector de placas VICTOR3 V. Todas las muestras se sembraron y midieron por triplicado.

En el caso de los *polyplexes* derivados del sistema poli-(VP-co-VPcpx), la toxicidad se determinó mediante el análisis de la viabilidad celular de las células tras el ensayo de transfección descrito anteriormente, realizando el ensayo con el reactivo fluorescente *Calceína AM (Molecular Probes)*, la cual es internalizada a través de la membrana plasmática de las células vivas, siendo por tanto un marcador de viabilidad celular. Para ello, una vez transcurridas las 72 horas de incubación desde su siembra en la placa de 96 pocillos, el medio fue retirado y las células se lavaron dos veces

con 100 μL con PBS (tampón fosfato de condiciones fisiológicas). Después, se añadieron 100 μL de una solución de calceína (4 $\mu\text{g/mL}$) a cada pocillo, con las que las células fueron incubadas durante 30 minutos en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO_2 . Transcurrido ese tiempo, la fluorescencia de cada pocillo (λ_{ex} 495 nm, λ_{em} 515 nm) fue medida usando un lector de placas usando un lector de placas BioTek Synergy HT (Biotek Instruments) siendo los resultados normalizados respecto a las células sin tratar (100% viabilidad celular). Todas las muestras se sembraron y midieron por triplicado. Además, se realizó una comparación entre pocillos mediante un análisis cualitativo de fluorescencia utilizando el microscopio de invertido de fluorescencia (Olympus IX51) con un filtro FITC (λ_{ex} 496 nm, λ_{em} 519 nm) usando el software de análisis CellID (Olympus).

2.3.3. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados de transfección y toxicidad fue realizado con el software GraphPad Prism 6, mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, para valorar la influencia tanto del polímero como de la relación polímero/ADN utilizados. En comparación con el polímero control, se consideró una diferencia estadísticamente significativa en aquellos resultados con un nivel de significación (p valor) inferior a 0.05. Con el objetivo de simplificar la representación gráfica, se denotaron con el símbolo * a aquellos valores significativamente diferentes a los obtenidos por los sistemas control.

3. Resultados y discusión

3.1 Descripción de los polímeros y del estudio

Se han evaluado un total de 20 polímeros derivados de VP portadores de aminas laterales, número que incluye los porcentajes molares de 20, 40, 60, 80 y 100 para cada uno de los cuatro sistemas poliméricos de la Figura 4.3. Para facilitar la lectura de este estudio, se ha identificado los sistemas con las etiquetas poli-(VP-co-VPNH₂)-Y y poli-(VP-co-VPcpx)-Y, donde Y indica el porcentaje molar nominal de unidad aminada (20, 40, 60, 80) y VPNH₂ y VPcpx (donde x es l, p o z (Figura 4.3-B)) representan la naturaleza de la amina: primaria, pirrolidona, piperidina o piperazina respectivamente. Los porcentajes molares de 100 corresponden obviamente a los homopolímeros aminados, usando las etiquetas homopoli-VPNH₂ y homopoli-VPcpx (donde x es l, p y z) según corresponda.

Por otra parte, ya que el sistema portador de aminas primarias se estudió en la Universidad Nacional de Irlanda siguiendo un protocolo ligeramente diferente al usado en la Universidad Complutense de Madrid para el estudio de los sistemas portadores de aminas cíclicas, este apartado de Resultados y Discusión se ha estructurado en los dos bloques correspondientes. Los dos protocolos son muy similares pero presentan las diferencias que se indican en la Tabla 4.1. Hay que señalar que el estudio de Galway es anterior el de Madrid, y que algunas de las diferencias responden a una optimización de éste método llevado a cabo en último lugar. La diferencia más

notable reside en el cambio del número de horas de incubación de las células tras su tratamiento con los *polyplexes*, así como el método elegido para evaluar la citotoxicidad. Al aumentar el tiempo de incubación, se permite una expresión óptima de la proteína siendo 24 horas posiblemente un periodo insuficiente para la total expresión de la misma. Además, debido al crecimiento y división celular, la siembra pasa a ser de 10000 células (en el caso del protocolo de Galway) a 5000 células (para el protocolo de Madrid) ya que el tiempo de incubación total desde su siembra pasa a ser de 48 horas a 72 horas, pudiendo llegar a un sobrecrecimiento de las mismas que implicaría la muerte celular. En el caso del protocolo de Galway, el ensayo de Alamar Blue expresa actividad metabólica, mientras que el protocolo de Madrid expresa viabilidad celular. El primero mide la actividad mitocondrial de las células vivas, la cual depende de muchos factores ya que podría darse el caso en que la actividad metabólica fuese elevada por una actividad normal de todas las células, o porque muchas de ellas estén estresadas debido a la alta toxicidad por la presencia de los *polyplexes*. El ensayo con calceína en cambio mide la viabilidad celular, indicando cuántas células siguen vivas en el medio de cultivo.

Tabla 4.1: Comparación de los protocolos seguidos

	Protocolo de Galway Sistema poli-(VP-co-VPNH ₂)	Protocolo de Madrid Sistemas poli-(VP-co-VPcpx)
Relaciones N/P	1:1 a 30:1	1:1 a 10:1
Polímero control	PLL en relación N/P 10:1 (optimizada) ³³	PEI a todas las relaciones N/P
Nº de células	10000	5000
Tiempo de ensayo de transfección	24 horas	48 horas
Método evaluación de citotoxicidad	Alamar blue	Calceína
Tiempo desde la siembra hasta el ensayo de citotoxicidad	48 horas	72 horas

3.2. Polímeros de PVP portadores de grupos -NH₂

3.2.1. Análisis de los *polyplexes*

La capacidad de complejación de ADN de cada polímero sintetizado se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.4), utilizando diferentes relaciones molares N/P para la obtención de los *polyplexes*. El tamaño y carga de los mismos se analizaron respectivamente por DLS y mediante la evaluación del potencial ζ (Figura 4.5).

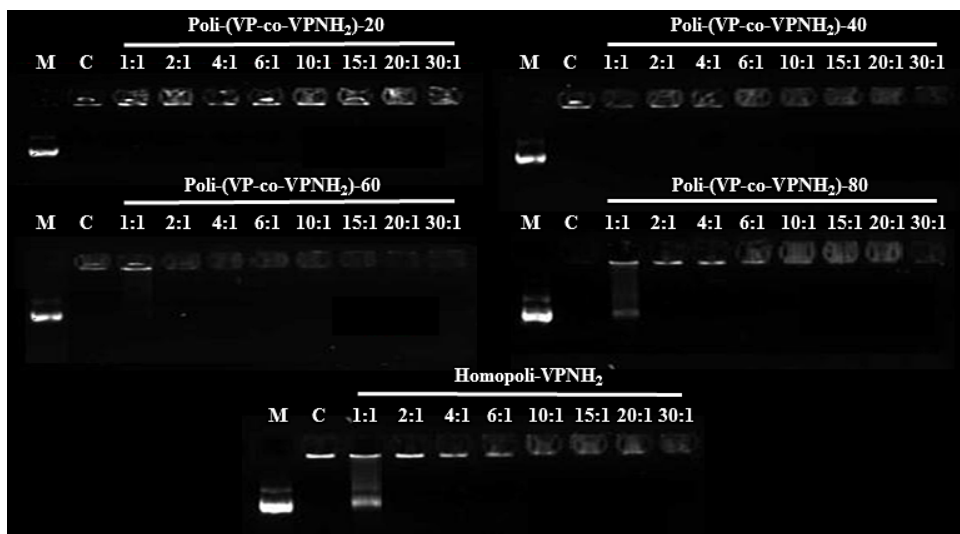


Figura 4.4: Movilidad electroforética del ADN plasmídico en los complejos polímero/ADN de a diferentes relaciones N/P, utilizando los polímeros poli(VP-co-VPNH₂). M = ADN libre. C = complejos PLL/ADN a N/P 10:1.

En el ensayo de electroforesis, se aplica un potencial eléctrico a una disolución de tampón TAE donde se encuentra inmerso el gel de agarosa con los diferentes *polyplexes*, así como el ADN libre que sirve como referencia. Al aplicar el voltaje, las partículas cargadas negativamente (el ADN tiene carga neta negativa debido a los grupos fosfato de su estructura) se desplazan al polo positivo. En cambio, si el ADN está complejado por macromoléculas, la carga será compensada y migrará más lentamente o no migrará (si la complejación es total). En la Figura 4.4 se muestra la movilidad electroforética del plásmido pCMV-GLuc libre (M) frente a los *polyplexes* formados con los polímeros de poli(VP-co-VPNH₂) y el plásmido a diferentes relaciones N/P (desde 1:1 a 30:1). Además, se indica con la letra C el control positivo de PLL en una relación N/P 10:1. Se puede observar cómo el plásmido está completamente complejado a relaciones N/P iguales o superior a 2:1. En el caso de la relación N/P 1:1, los sistemas de con una carga molar de amina del 80 y 100% mostraron una complejación parcial. Esto puede estar relacionado con la mayor densidad de carga segmental en estas cadenas de polímero (comparado con las composiciones más ricas en VP), que puede hacer la ionización o la accesibilidad de todas las aminas más difícil.

Las medidas del tamaño de partícula que se muestran en la Figura 4.5-A son datos seleccionados que corresponden a los *polyplexes* con relación N/P de 4:1 a 15:1; se ha reducido la presentación de medidas con el objetivo de simplificar la representación gráfica y mostrar los resultados más representativos del estudio. El tamaño de partícula de estos complejos se encontró en el rango de 100-250 nm, dentro del considerando rango óptimo de tamaño de partícula para su internalización en la célula. En cuanto a la carga, se considera que los valores del potencial ζ deben ser +30 mV como mínimo para tener cierta estabilidad en disolución. En el caso de estos complejos (Figura 4.5-B), se determinaron valores de entre +40 y +50 mV, lo que corresponde a partículas con una carga

positiva estables. Además, es una carga alta lo que da a entender que la mayor parte de los grupos amino están cargados y muchos se encuentran en la superficie del complejo. En el caso de los complejos obtenidos a partir del copolímero poli-(VP-co-VPNH₂)-20, la carga fue algo inferior (en torno a +30 mV), probablemente debido a su menor densidad segmental de carga ya que es la composición menos rica en aminos.

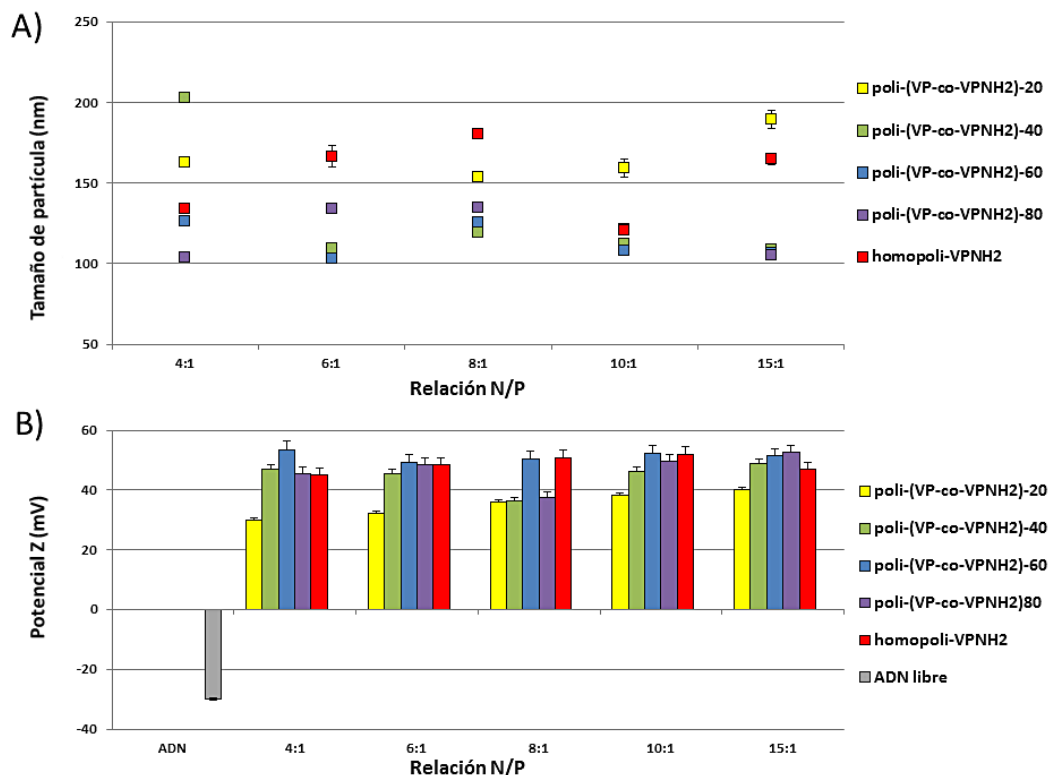


Figura 4.5: Representación comparativa de los tamaños de partícula de los polyplexes obtenidos a diferentes relaciones polímero/ADN en agua MilliQ (A) y de su carga en superficie (potencial ζ) (B), tomando en este último caso como referencia la carga del ADN libre.

3.2.2. Estudio de la respuesta celular

Después de 24 horas tras la siembra de las células en placas de 96 pocillos tal y como se describe en la sección Experimental, las células fueron incubadas junto a los *polyplexes* durante 4 horas en ausencia de suero, tiempo suficiente para su internalización. Transcurrido ese tiempo, se cambió el medio por medio completo (con suero y antibiótico) y se incubaron las células durante 24 horas más. Tras ese tiempo, se realizaron las medidas de luminiscencia para determinar la eficacia de los polímeros en transfección. Además, se utilizó como control negativo el plásmido sin polímero, el cual dio nula transfección, al igual que las células sin tratar, debido a que el ADN tiene dificultad para internalizarse en la célula sin polímero. Por ello, estos resultados no han sido representados en esta tesis. Además, se utilizaron como controles positivos los *polyplexes* obtenidos con el ADN y el

polímero PLL en la relación antes indicada (10:1). En la Figura 4.6-A se puede observar los resultados obtenidos en unidades relativas de luminiscencia (URLs). Los datos de los copolímeros poli-(VP-co-VPNH₂)-20 no se representaron debido a su capacidad nula para transfectar. Los niveles de toxicidad de los *polyplexes* se evaluaron mediante el análisis de la actividad metabólica (con el reactivo comercial Alamar Blue) de las células tras el ensayo de transfección. En la Figura 4.6-B se muestran los resultados obtenidos.

Se puede observar que tanto la eficiencia de transfección como la citotoxicidad dependen de la composición y de la relación N/P. Enfocando primero en el estudio de actividad metabólica, es de destacar la completa citocompatibilidad del copolímero con mayor cantidad de VP (copolímeros con una modificación igual o menor al 40%) incluso a relaciones con un gran exceso de polímero como 30:1. Este efecto debe de ser asociado al efecto compatibilizante de la unidad VP. Las otras composiciones con un exceso molar de unidad cationizable portadora de amina muestran una dependencia típica de policationes: cuanto mayor es la relación N/P (y mayor es el exceso de polímero), menor es la viabilidad celular. Se considera que entidades con alta densidad de carga positiva interaccionan perjudicialmente con las membrana plasmática y nuclear, favoreciendo la desestabilización de su estructura y la muerte celular. Volviendo a la gráfica 4.6-B, hay que señalar que el homopolímero es menos citotóxico que el copolímero modificado un 80% (y similar al del 60%) a pesar de tener mayor densidad segmental de carga. Ya que los estudios se han llevado a cabo normalizados a la cantidad de plásmido, esta menor citotoxicidad del homopolímero puede explicarse por la menor cantidad de polímero usado.

En cuanto a eficiencia de transfección, los sistemas más ricos en VP (y por tanto más citocompatibles), poli-(VP-co-VPNH₂)-40 y poli-(VP-co-VPNH₂)-60. Estos copolímeros alcanzaron unos niveles de transfección de hasta 10 y 7 veces más que el control positivo de PLL (10:1) para unas relaciones N/P de 4:1 ó 8:1 respectivamente. Analizando globalmente las cuatro composiciones, cada una de ellas muestra una dependencia con la relación N/P cualitativamente similar, encontrando una relación N/P donde muestra un máximo de eficiencia.

Observando ambas gráficas de la Figura 4.6, se podría resumir que el balance transfección/citotoxicidad obtenido por los sistemas estudiados fue óptimo en el polímero con un valor del 40% de funcionalización, seguido por el copolímero con un 60%. Los datos obtenidos dan a entender que existe un rango composicional (40-60%) donde el balance de ambos monómeros en la estructura al azar del polímero estadístico permite a la vez una alta eficiencia en complejación y transfección. Este tipo de distribución estructural estadística (muy distinto al de los polímeros de bloque o de injerto)^{35, 36} hace que la densidad segmental de carga en este rango composicional óptimo sea menor que en el caso de los controles policationicos, hecho que puede influir en la citotoxicidad y en la liberación citosomal del ADN.

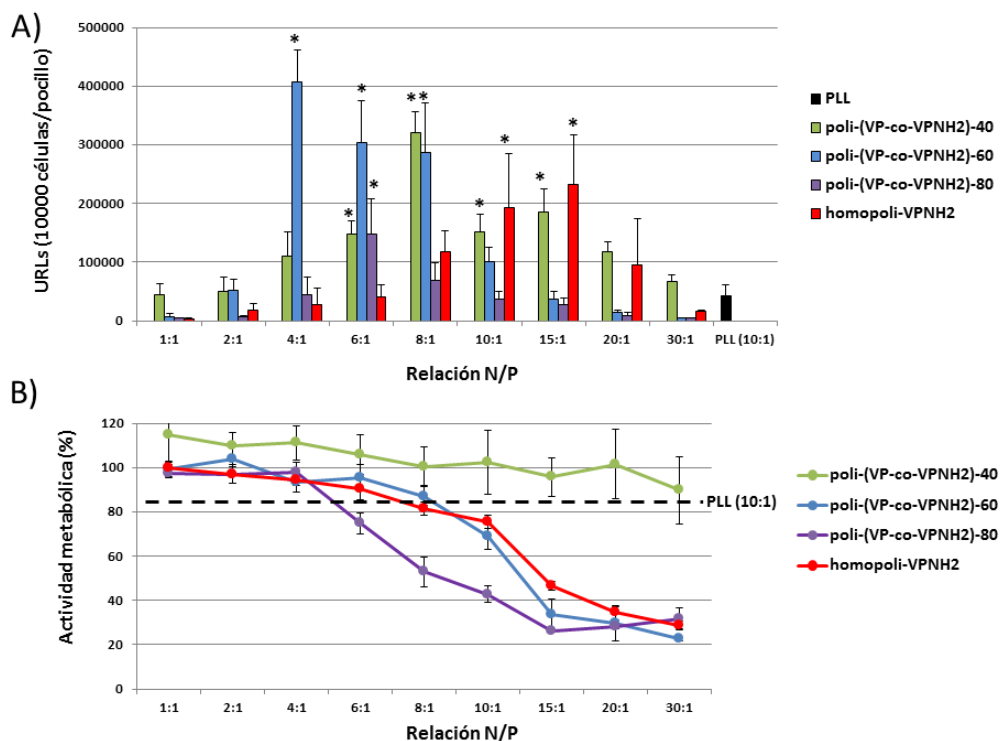


Figura 4.6: Eficiencia en transfección de los *polyplexes* obtenidos a diferentes relaciones N/P (polímero/ADN) expresada en Unidades Relativas de Luminiscencia (URLs) en fibroblastos Swiss 3T3 (A), y la actividad metabólica de los fibroblastos Swiss 3T3 tras el ensayo de transfección, mediante un ensayo con Alamar Blue (B), donde se denota con una línea discontinua la actividad metabólica obtenida del control PLL con una relación N/P 10:1. * denota una diferencia significativa entre los resultados indicados con el de referencia (PLL) ($p < 0.05$ ANOVA de una vía).

3.3. Polímeros de PVP portadores de grupos pirrolidina, piperidina y piperazina

3.3.1. Análisis de los *polyplexes*

La capacidad de complejación de ADN de cada polímero sintetizado se evaluó también mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 4.7 y Anexo 4), utilizando diferentes relaciones molares N/P para la obtención de los *polyplexes*. El tamaño y carga de los mismos se analizaron respectivamente por DLS y mediante la evaluación del potencial ζ (Figura 4.8 y Figura 4.9, respectivamente).

En la Figura 4.7 se muestra a modo de ejemplo la movilidad electroforética del plásmido pCMV-GLuc libre (M) frente a los *polyplexes* formados con los polímeros de poli-(VP-co-VPcpl) y el plásmido a diferentes relaciones N/P (desde 2:1 a 10:1). Además, se indica con la letra C el control positivo de PEI en una relación N/P 8:1. Se puede observar como el plásmido está completamente complejoado en prácticamente todas las relaciones N/P, independientemente del grado de funcionalización. En el Anexo 4, se encuentran los geles de agarosa obtenidos para los *polyplexes* generados a partir de los polímeros portadores de grupos piperidina y piperazina (Sección 4.1 y 4.2

respectivamente). En el caso de los polímeros de piperidina, se observa también una efectiva complejación del plásmido para todas las relaciones N/P estudiadas. Para los polímeros portadores de piperazina, el carácter difuncional del anillo (debido a la presencia de una amina secundaria y una terciaria por unidad monomérica de VPcpz) hizo que se necesitaran cantidades menores de polímero en todas las relaciones N/P. La efectividad para compensar la carga del ADN plasmídico fue peor que el resto de polímeros. En la Sección 4.2 del Anexo 4 se puede observar cómo las cargas son compensadas en relaciones N/P igual o superior a 4:1, existiendo una complejación efectiva a N/P 2:1 únicamente en el caso de los copolímeros con 60 y 80% de piperazina. Este resultado indica que es muy difícil que las dos aminas del ciclo sean eficientes en complejación, debido a su cercanía estructural, que hace que le sea difícil al polímero ofrecer conformaciones donde las dos cargas sean eficientes en complejación.

Las medidas del tamaño de los *polyplexes* de los tres sistemas se muestran en la Figura 4.8, siendo el rango de tamaños de 200-500 nm para los obtenidos a partir de los polímeros funcionalizados con pirrolidina (A) y piperidina (B), y de 100-300 nm para los funcionalizados con piperazina (C). Hay que resaltar que, comparando globalmente los tamaños de los cuatro sistemas, los copolímeros portadores de aminas primaria (VP-NH₂) y secundaria (piperazina) dan lugar a *polyplexes* con menor tamaño de promedio que los otros dos sistemas portadores únicamente de aminas terciarias. Por otra parte, y como tendencia general, el tamaño de partícula es superior a relaciones N/P de 2:1, tal vez debido a la menor densidad segmental de carga y a la correspondiente menor repulsión electrostática, que permite la formación de agregados de mayor tamaño. Esto está de acuerdo con la menor carga superficial de los *polyplexes* en la relación 2:1, comparado con las otras relaciones, como se menciona a continuación.

En la Figura 4.9 se muestran los valores del potencial ζ de los complejos. Todos muestran carga positiva, a excepción de los obtenidos a partir de los polímeros portadores de grupos piperazina y con una relación N/P de 2:1, que presentaron una carga neta negativa (entre -15 y -25 mV). Esto está de acuerdo con lo observado en electroforesis y la mencionada ineficacia de las dos aminas del ciclo. Para el resto de los sistemas, se intuye una tendencia dependiente de la composición: cuanto mayor es la cantidad de amina, parece que mayor es en promedio el potencial ζ . Muchos de los complejos, a excepción de los polímeros con un 20% de amina en su estructura y a ratios N/P inferiores a 6:1, muestran valores cercanos o superiores a +30 mV que, como mencionamos anteriormente, se considera el límite para tener entidades con cierta estabilidad en disolución.

Un conjunto de polímeros interesante es el del sistema piperazina a una relación N/P 2:1, ya tienen carga superficial negativa (y complejación parcial) y tamaños en torno a 200 nm.

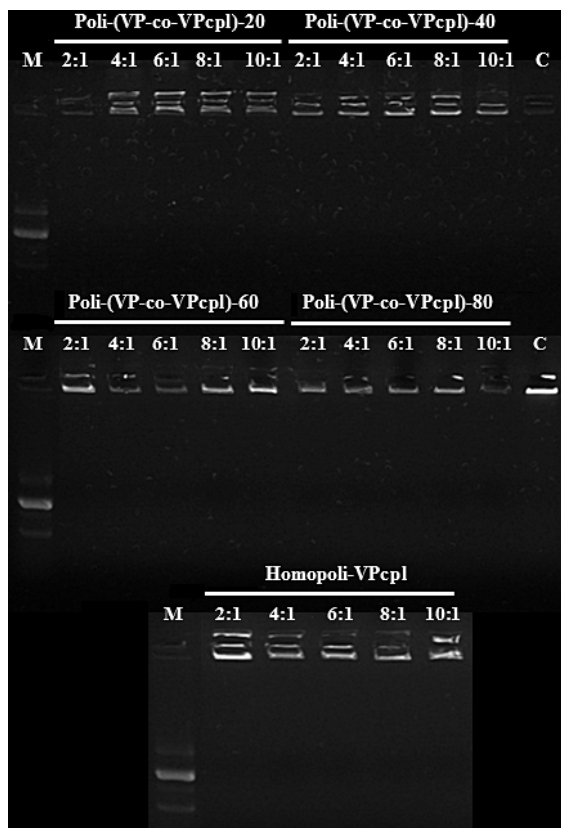


Figura 4.7: Movilidad electroforética del ADN plasmídico en los complejos polímero/ADN de a diferentes relaciones N/P, utilizando los polímeros poli-(VP-co-VPcpl). M = ADN libre. C = complejos PEI/ADN a N/P 8:1.

3.3.2. Estudio de la respuesta celular

Después de 24 horas tras la siembra de las células en placas de 96, las células fueron incubadas junto a los *polyplexes* durante 4 horas en ausencia de suero. Transcurrido ese tiempo, se cambió el medio por medio completo (con suero y antibiótico) y se incubaron las células esta vez durante 48 horas más. Tras ese tiempo, se realizaron las medidas de luminiscencia para determinar la eficacia de los polímeros en transfección. En este caso, también se utilizó como control negativo el plásmido sin polímero, que como se ha mencionado no transfecta (mismo resultado que células sin tratar). Estos resultados no han sido representados en esta tesis. Además, se utilizaron como controles positivos los *polyplexes* obtenidos con el ADN y el polímero PEI en la misma relación N/P que los polímeros evaluados.

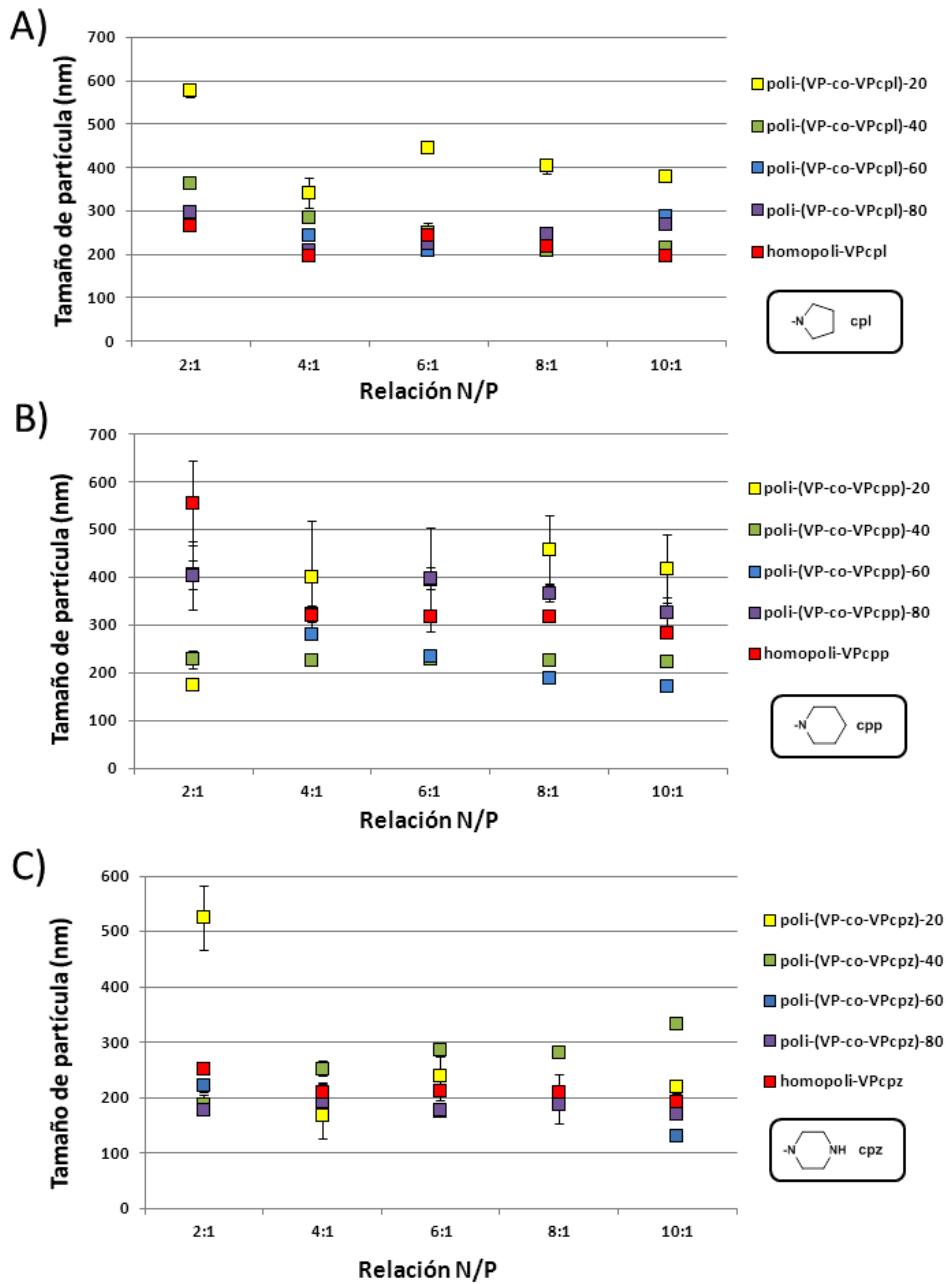


Figura 4.8: Representación comparativa de los tamaños de partícula de los *polyplexes* obtenidos a diferentes relaciones polímero/ADN en agua MilliQ, usando los polímeros portadores de pirrolidina (A), piperidina (B) y piperazina (C).

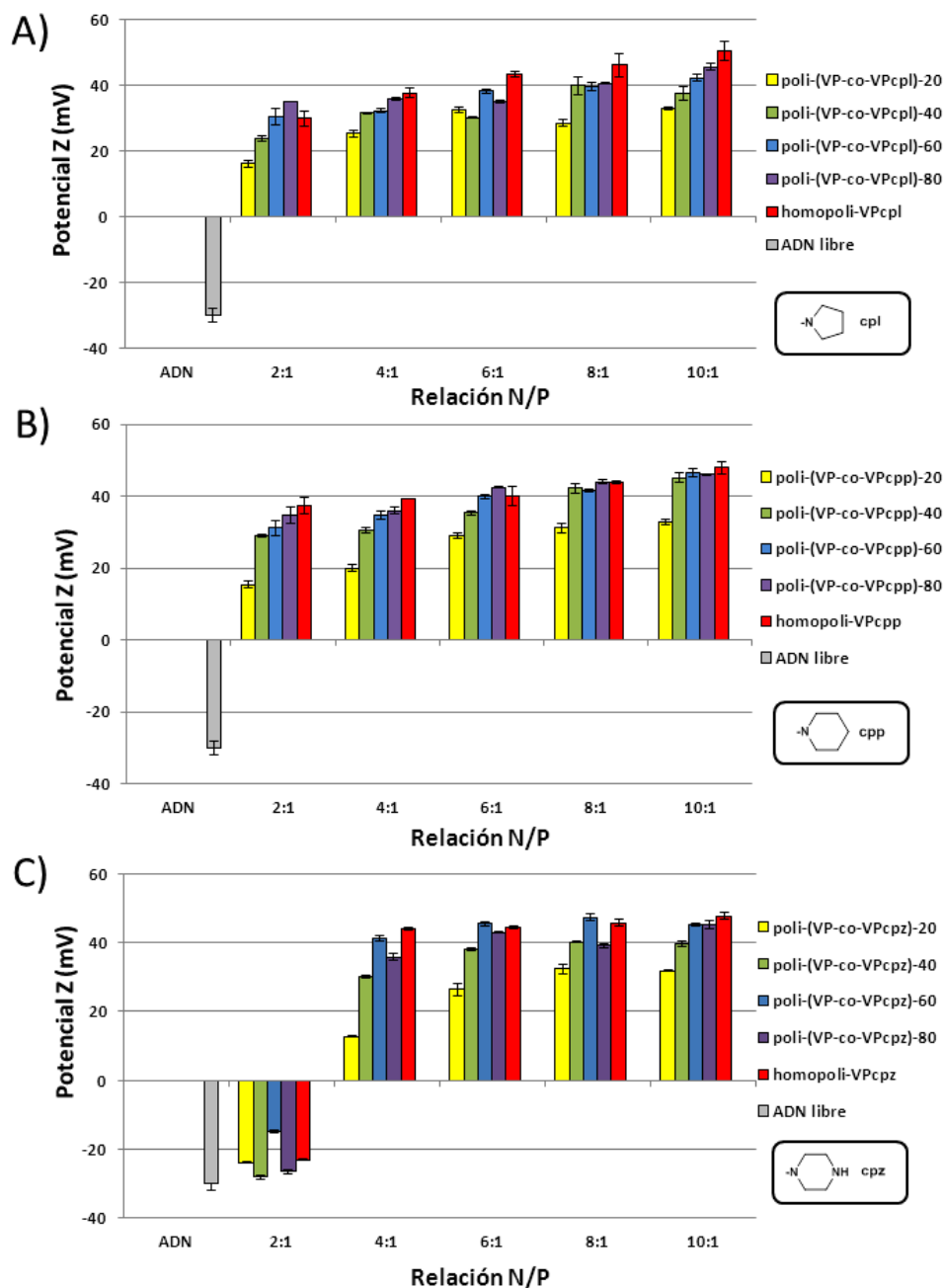


Figura 4.9: Representación comparativa de la carga en superficie (potencial ζ) de los *polyplexes* obtenidos a diferentes relaciones polímero/ADN en agua MilliQ, usando los polímeros portadores de pirrolidina (A), piperidina (B) y piperazina (C), tomando como referencia la carga del ADN libre.

En las Figuras 4.10-A, 4.11-A y 4.12-A se pueden observar los resultados obtenidos en unidades relativas de luminiscencia (URLs) para los polyplexes obtenidos a partir de los polímeros portadores de grupos pirrolidina, piperidina y piperazina, respectivamente. Los niveles de toxicidad de estos complejos se evaluaron mediante el análisis de la viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3 con un ensayo con Calceína tras el ensayo de transfección, tal y como se describe en la parte Experimental. En las Figuras 4.10-B, 4.11-B y 4.12-B se muestran los resultados obtenidos de dicho ensayo de citocompatibilidad para los polyplexes obtenidos a partir de los polímeros portadores de grupos pirrolidina, piperidina y piperazina, respectivamente.

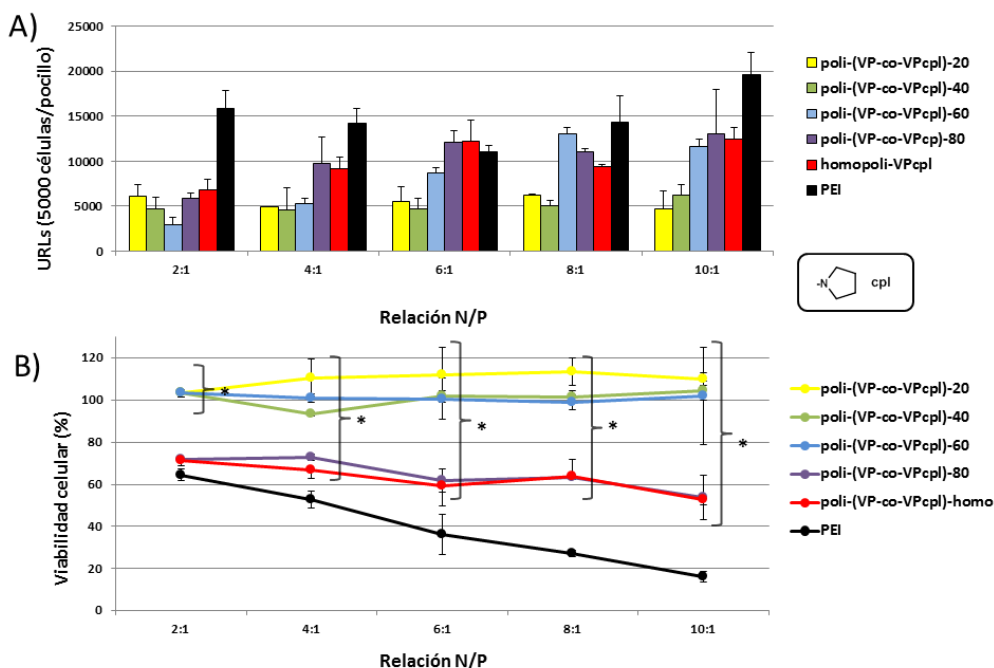


Figura 4.10: Eficiencia en transfección en fibroblastos Swiss 3T3 de los *polyplexes* obtenidos a partir de los polímeros funcionalizados con grupos pirrolidina a diferentes relaciones N/P (polímero/ADN) expresada en Unidades Relativas de Luminiscencia (URLs) (A), y viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3 tras el ensayo de transfección, mediante un ensayo con calceína (B). * denota una diferencia significativa entre los resultados indicados con el de referencia (PEI) analizado a la misma relación N/P ($p < 0.05$ ANOVA de una vía).

En el sistema formado por los polímeros portadores del grupo pirrolidina se obtuvieron unos resultados de transfección en promedio ligeramente inferiores a los del control positivo utilizado (PEI hiperramificada). Los mejores resultados de transfección se encontraron para funcionalizaciones iguales o superiores al 60%, para relaciones N/P superiores a 4:1 como se muestra en el diagrama de barras comparativo de la Figura 4.10-A. Es de destacar que la viabilidad celular para los polímeros de hasta un 60% de pirrolidina fueron prácticamente un 100%, siendo significativamente menos tóxico ($p < 0.05$) que la PEI (Figura 4.10-B). Los polímeros con un 20 y

40% dieron valores de transfección más bajos que el sistema control de PEI. Para una mayor presencia de amina en el polímero, 80% de amina o homopolímero, se obtuvo un descenso de la viabilidad celular (hasta un 60% en el homopolímero), siendo aun así significativamente menos tóxico que la PEI en esa relación N/P, que hizo disminuir la viabilidad celular al 20%.

Respecto al sistema formado por polímeros portadores del grupo piperidina, los resultados en el ensayo de transfección fueron comparativamente mejores que los anteriores del sistema de pirrolidina, en promedio similares a los del control PEI e incluso en algunos casos (el sistema con un 60% de amina o el homopolímero) superándolo en eficiencia, aunque en este caso sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el polímero funcionalizado un 60% con piperidina con frente a este control. Es de destacar que los copolímeros con un 40, 60 y 80% de grado de animación fueron significativamente más citocompatibles que el control PEI o el homopolímero, destacando en este sentido el sistema del 40% que mostró una completa citocompatibilidad a todas las relaciones N/P. El homopolímero es comparativamente igual de tóxico que el control de PEI, disminuyendo la viabilidad celular hasta el 10% en el caso de N/P 10:1.

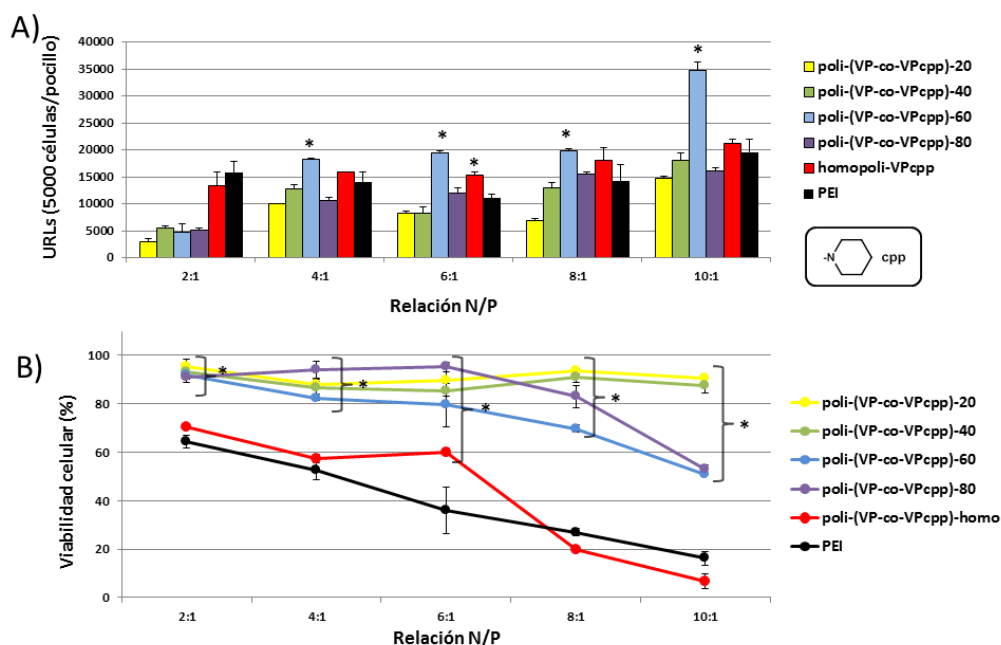


Figura 4.11: Eficiencia en transfección en fibroblastos Swiss 3T3 de los *polyplexes* obtenidos a partir de los polímeros funcionalizados con grupos piperidina a diferentes relaciones N/P (polímero/ADN) expresada en Unidades Relativas de Luminiscencia (URLs) (A), y viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3 tras el ensayo de transfección, mediante un ensayo con calceína (B). * denota una diferencia significativa entre los resultados indicados con el de referencia (PEI) analizado a la misma relación N/P ($p < 0.05$ ANOVA de una vía).

Los resultados obtenidos del ensayo de transfección con los polímeros portadores de grupos piperazina fueron parecidos a los obtenidos por el sistema de polímeros portadores de pirrolidina (Figura 4.12-A), es decir, en promedio inferiores al control PEI. Sólo en determinados casos se obtuvieron eficiencias iguales o mayores que los del control positivo (por ejemplo, en relaciones N/P 1:1 y 6:1), siendo el copolímero poli-(VP-co-VPcpz)-60 el que presentó mejores resultados, comparables a los de PEI en todos los ratios N/P con valores significativamente parecidos. Además, junto con los otros dos copolímeros de menor grado de aminación (20 y 40%), se obtuvieron porcentajes de viabilidad celular de hasta el 80% en la mayoría de las condiciones, significativamente menos tóxico que los obtenidos por la PEI (hasta un 30-20% de viabilidad celular) (Figura 4.12-B). Hay que destacar los resultados positivos en transfección aun existiendo carga neta negativa de los *polyplexes* a N/P 2:1, carga negativa que recordemos se había asignado a una incompleta eficiencia de las aminas en complejación por la cercanía estructural de las dos aminas del ciclo. Respecto a la viabilidad celular, todos los polímeros fueron menos citotóxicos que el control PEI, destacando los de menor carga de amina, que fueron significativamente más citocompatibles. Comparando este sistema con los dos anteriores, los polímeros con menor grado de aminación parecen ser comparativamente menos citocompatibles (en torno al 80%) que los polímeros portadores de pirrolidina y piperidina con igual grado de funcionalización (100 y 80%, respectivamente), todo ello dentro de la superioridad clara de todos ellos frente al control PEI.

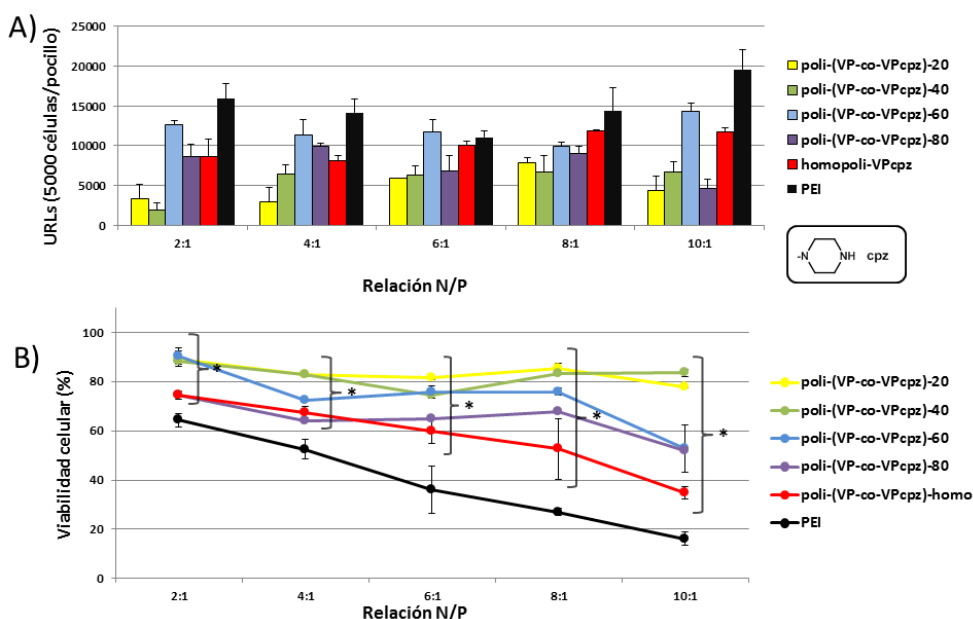


Figura 12: Eficiencia en transfección en fibroblastos Swiss 3T3 de los *polyplexes* obtenidos a partir de los polímeros funcionalizados con grupos piperazina a diferentes relaciones N/P (polímero/ADN) expresada en Unidades Relativas de Luminiscencia (URLs) (A), y viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3 tras el ensayo de transfección, mediante un ensayo con calceína (B). * denota una diferencia significativa entre los resultados indicados con el de referencia (PEI) analizado a la misma relación N/P ($p < 0.05$ ANOVA de una vía).

A modo de resumen de los resultados obtenidos con las composiciones intermedias de estos sistemas basados en polímeros de PVP portadores de aminas cíclicas (pirrolidina, piperidina y piperazina), se representa en la Figura 4.13 la eficiencia de transfección de los polyplexes en fibroblastos Swiss 3T3 frente a la viabilidad celular, pudiéndose observar las diferencias más representativas de una selección de resultados. En este caso, se muestran los resultados correspondientes a los copolímeros con un 40, un 60 y un 80% de amina en su estructura, en las relaciones N/P 4:1, 6:1 y 8:1, así como los resultados obtenidos por el control PEI en las mismas relaciones N/P. En la Figura 4.13 se diferencian cuatro cuadrantes delimitados por dos líneas rojas discontinuas correspondientes al valor de 10000 URLs (tomado como límite positivo de eficiencia en el ensayo de transfección basado en el menor valor representado del control PEI) y al valor de 75% de viabilidad celular (tomado como valor límite de viabilidad celular en el ensayo de citotoxicidad, considerando como tóxicos a valores inferiores). Los resultados obtenidos con los polímeros sintetizados se encuentran por encima del límite de citotoxicidad o cercanos a él, teniendo siempre una viabilidad celular superior al 60%, al contrario que los resultados obtenidos con el control de PEI, que se encuentran por debajo del 60%. En general, los polímeros por debajo del límite de citotoxicidad son aquellos que tienen un grado de aminación del 80%, encontrándose cerca del límite los del 60%, a excepción de los portadores de pirrolidina, cuya viabilidad celular es próxima al 100%. Aquellos polímeros con un resultado menor a 10000 URLs suelen ser aquellos con un grado de aminación del 40%, siendo también muy poco citotóxicos. Los copolímeros portadores de grupos piperidina que se muestran en la figura resultaron igual de eficientes que los controles de PEI, pero con un nivel de citotoxicidad mucho menor (por encima de la línea del 75%). Además, los resultados obtenidos por aquellos polímeros funcionalizados con un 60% de piperidina resultaron incluso más efectivos que los controles (18000-20000 URLs).

Haciendo un análisis conjunto de los tres sistemas, los estudios de viabilidad han demostrado el efecto citocompatibilizante de la VP y del esqueleto tipo PVP, ya que una gran mayoría de los sistemas –incluidos algunos puntos de los homopolímeros– son más citocompatibles que el control PEI con una diferencia estadísticamente significativa. Cuanto mayor es la composición de VP menor es la citotoxicidad, siendo muchos de los sistemas con un 20 y 40% de amina totalmente citocompatibles. Es de destacar que muchos de estos sistemas de alta citocompatibilidad tienen eficiencias de transfección que no son estadísticamente diferentes del control PEI, de igual manera que el resto de las composiciones. El sistema portador de piperidina parece ser ligeramente superior a los otros dos en eficiencia de transfección.

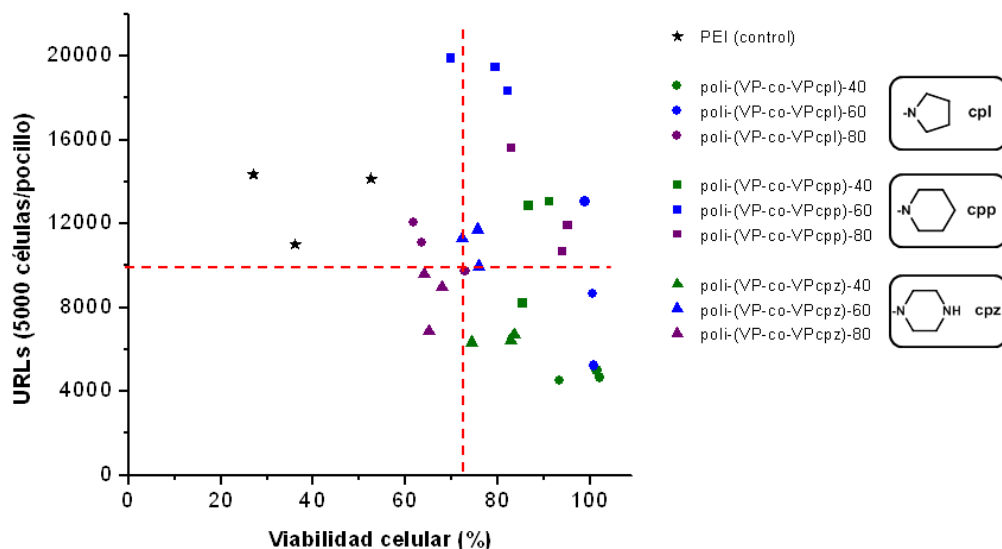


Figura 4.13: Representación de la eficiencia de transfección en Unidades Relativas de Luminiscencia (URLs) de los polímeros estudiados con un grado de aminación de 40, 60 y 80%, frente a su viabilidad celular en fibroblastos Swiss 3T3 a relaciones N/P de 4:1, 6:1 y 8:1.

En definitiva, para cada uno de los tres sistemas –y al igual que ocurría en el sistema portador de amina primaria– se ha encontrado que el rango composicional intermedio (40-60%, e incluso en el caso de la piperidina el 80%) que presenta un balance global eficiencia de transfección/citocompatibilidad excelente, superior al control PEI. En este rango composicional e contenido en VP y del esqueleto PVP, así como la densidad segmental de carga (inferior a la del homopolímero o a la del control), hacen a los sistemas citocompatibles y eficientes en transfección. La eficiencia de transfección puede estar relacionada con un gran número de parámetros; así, la propia densidad de carga y la carga superficial tienen una gran influencia en la complejación y liberación intracelular del ADN, así como en la interacción con la membrana celular y con fenómenos de citotoxicidad e internalización. Es de destacar el sistema de piperazina en relación 2:1, que aun presentando una carga superficial negativa ha mostrado ser eficiente en transfección. El tamaño del *polyplex* también es importante en la acción de los complejos, aunque no se ha encontrado una correlación clara entre tamaño y respuesta celular. La naturaleza de la amina es importante ya que modula la interacción con el ADN y con la membrana celular, y tiene una influencia importante es la salida del complejo del lisosoma (y en su participación en la bomba de protones). En este sentido, parece que los sistemas portadores solo de amina terciaria (pirrolidina y piperidina) forman *polyplexes* de mayor tamaño y son ligeramente más citocompatibles que los otros dos, portadores de amina primaria y secundaria. No se ha encontrado sin embargo una correlación de estos aspectos con la eficiencia de transfección.

Por último, se realizó un análisis cualitativo de las células marcadas con el reactivo Calceína AM usado en los ensayos de citotoxicidad de los polímeros. La calceína es una molécula fluorescente, el

cual es internalizado a través de la membrana plasmática de las células vivas, siendo por tanto un marcador de viabilidad celular que permite un análisis cualitativo del cultivo celular por microscopía de fluorescencia. Para ello, se tomaron diferentes micrografías en el microscopio de fluorescencia 20 minutos después de la incubación de los fibroblastos Swiss 3T3 con calceína (a 37 °C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda) después del ensayo de transfección de 48 horas (Figura 4.14).

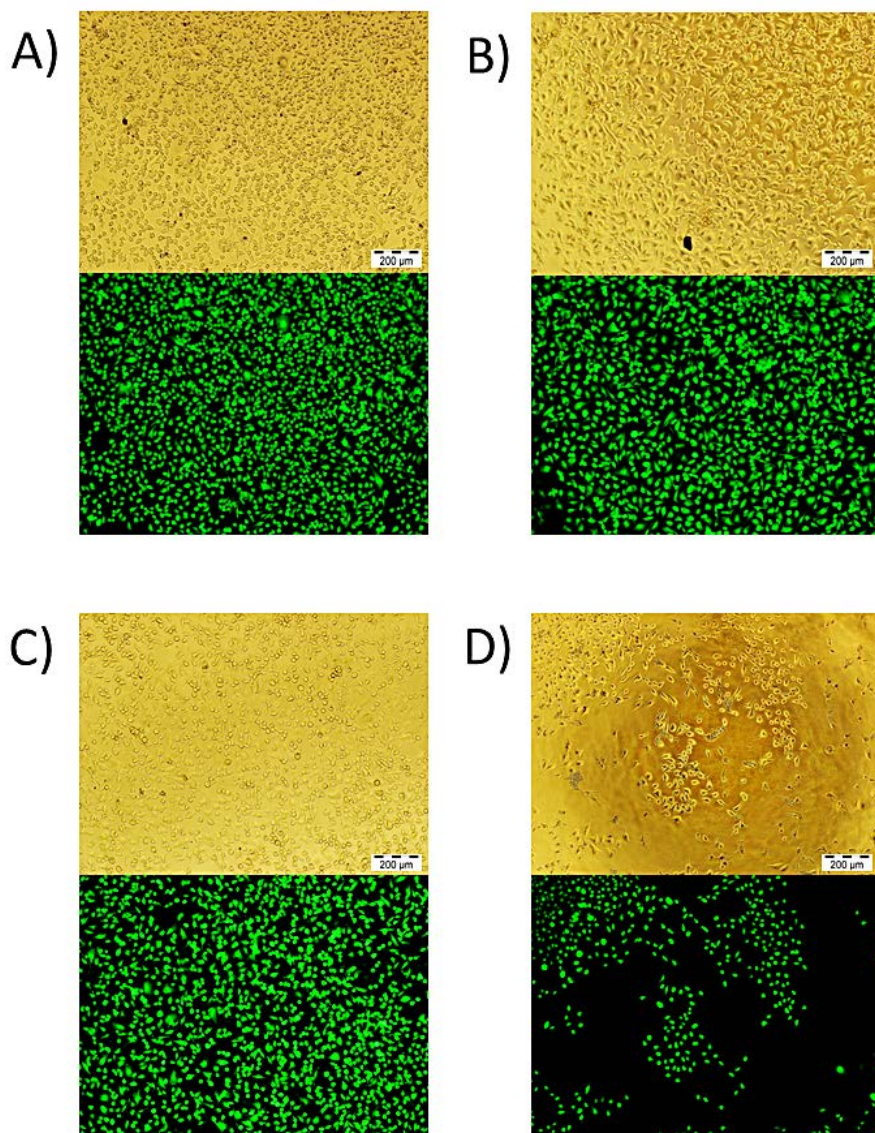


Figura 4.14: Micrografías obtenidas tras 20 minutos de incubación de los fibroblastos Swiss 3T3 con calceína después del ensayo de transfección con los *polyplexes* obtenidos a partir de los polímeros poli-(VP-co-VPcpl)-60 (A), poli-(VP-co-VPcpp)-60 (B), poli-(VP-co-VPcpz)-60 (C) y PEI hiperramificada (D), a una relación N/P de 8:1.

Como se puede observar en la Figura 4.14, las células incubadas con los *polyplexes* obtenidos de los copolímeros funcionalizados un 60% con pirrolidina (A), piperidina (B) y piperazina (C) crecieron con normalidad, observándose además que la mayoría de las células se mantienen vivas (células fluorescentes marcadas con calceína) tras el ensayo de transfección de 48 horas. En cambio, las células incubadas con los *polyplexes* obtenidos a partir del polímero control PEI hiperramificada (D) proliferaron menos denotando una mayor citotoxicidad por parte de los *polyplexes* añadidos al medio de cultivo, pudiéndose observar que un gran número de células presentes no emiten fluorescencia al encontrarse muertas. Este análisis cualitativo está de acuerdo con los resultados representados en la Figura 4.13, el cual muestra que la viabilidad celular en los ensayos llevados a cabo para esas relaciones N/P con estos polímeros sintéticos derivados de PVP era superior al 75%, mientras que la citotoxicidad de los *polyplexes* de PEI no superaban el 55% de viabilidad celular en ninguno de los casos.

4. Conclusiones

Los copolímeros estadísticos lineales portadores de unidades monoméricas de VP nativa y VPNH₂, cuya síntesis y caracterización están descritas en el Capítulo 2, han demostrado tener una alta eficiencia en transfección y una mayor citocompatibilidad en comparación con el polímero lineal de PLL, también portadora de aminas primarias, utilizado en este estudio como control.

La familia de polímeros derivados de VP con las aminas cíclicas pirrolidina (VPcpl), piperidina (VPcpp) y piperazina (VPcpz) (cuya síntesis y caracterización están descritas en el Capítulo 3), han resultado ser también buenos agentes no virales de transfección, especialmente en el caso de los copolímero de composiciones intermedias. Usando como referencia el polímero ampliamente utilizado en ensayos de transfección PEI hiperramificada, una gran mayoría de estos polímeros estadísticos lineales mostraron no sólo mejor eficiencia en transfección a determinadas relaciones N/P, sino también una citotoxicidad muy inferior a la del polímero PEI.

Los estudios llevados a cabo han demostrado que inserción estadística de VP en cantidades suficientes, así como el propio esqueleto de PVP de los polímeros, hace a los complejos alta o totalmente citocompatibles, muy superiores a los controles PEI o PLL, que están formados únicamente por unidades aminadas. Además, algunos o muchas de las composiciones intermedias han mostrado una eficiencia de transfección similar o superior a la de los controles. Para los cuatro sistemas se han encontrado composiciones (del 40% y del 60%) superiores en balance global transfección/citocompatibilidad a los controles. Esta superioridad puede estar relacionada no solo con la presencia de unidades y de esqueleto citocompatible, sino también con la modulación de la densidad segmental de carga asociada a la distribución estadística de las unidades repetitivas.

5. Bibliografía

1. I. M. Verma and N. Somia, *Nature*, 1997, **389**, 239-242.
2. D. J. Glover, H. J. Lipps and D. A. Jans, *Nature Reviews Genetics*, 2005, **6**, 299-310.
3. L. Vannucci, M. Lai, F. Chiuppesi, L. Ceccherini-Nelli and M. Pistello, *New Microbiol*, 2013, **36**, 1-22.
4. S. Y. Wong, J. M. Pelet and D. Putnam, *Progress in Polymer Science*, 2007, **32**, 799-837.
5. T. Merdan, J. Kopeček and T. Kissel, *Advanced drug delivery reviews*, 2002, **54**, 715-758.
6. C. A. Fernandez and K. G. Rice, *Molecular pharmaceuticals*, 2009, **6**, 1277-1289.
7. N. Wiradharma, Y. Zhang, S. Venkataraman, J. L. Hedrick and Y. Y. Yang, *Nano Today*, 2009, **4**, 302-317.
8. M. S. Shim and Y. J. Kwon, *Advanced drug delivery reviews*, 2012, **64**, 1046-1059.
9. J. Kopeček, P. Kopečková, T. Minko and Z.-R. Lu, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*, 2000, **50**, 61-81.
10. L. Jin, X. Zeng, M. Liu, Y. Deng and N. He, *Theranostics*, 2014, **4**, 240.
11. O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J.-P. Behr, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, **92**, 7297-7301.
12. D. Oupicky, M. Ogris, K. A. Howard, P. R. Dash, K. Ulbrich and L. W. Seymour, *Molecular Therapy*, 2002, **5**, 463-472.
13. L. Medina-Kauwe, J. Xie and S. Hamm-Alvarez, *Gene therapy*, 2005, **12**, 1734-1751.
14. G. Y. Wu and C. H. Wu, *Journal of Biological Chemistry*, 1987, **262**, 4429-4432.
15. M. A. Wolfert, P. R. Dash, O. Nazarova, D. Oupicky, L. W. Seymour, S. Smart, J. Strohm and K. Ulbrich, *Bioconjugate chemistry*, 1999, **10**, 993-1004.
16. Y.-b. Lim, C.-h. Kim, K. Kim, S. W. Kim and J.-s. Park, *Journal of the American Chemical Society*, 2000, **122**, 6524-6525.
17. L. Wightman, R. Kircheis, V. Rössler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kursch and E. Wagner, *The journal of gene medicine*, 2001, **3**, 362-372.
18. S. Choosakoonkriang, B. A. Lobo, G. S. Koe, J. G. Koe and C. R. Middaugh, *Journal of pharmaceutical sciences*, 2003, **92**, 1710-1722.
19. J. Wang, P. Zhang, H. Mao and K. Leong, *Gene therapy*, 2002, **9**, 1254-1261.
20. J. Haensler and F. C. Szoka Jr, *Bioconjugate chemistry*, 1993, **4**, 372-379.

21. F. C. MacLaughlin, R. J. Mumper, J. Wang, J. M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe and A. P. Rolland, *Journal of Controlled Release*, 1998, **56**, 259-272.
22. M. Lee, J.-W. Nah, Y. Kwon, J. J. Koh, K. S. Ko and S. W. Kim, *Pharmaceutical Research*, 2001, **18**, 427-431.
23. H. Lee, J. H. Jeong and T. G. Park, *Journal of controlled release*, 2001, **76**, 183-192.
24. C.-H. Ahn, S. Y. Chae, Y. H. Bae and S. W. Kim, *Journal of controlled release*, 2002, **80**, 273-282.
25. D. Putnam, C. A. Gentry, D. W. Pack and R. Langer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, **98**, 1200-1205.
26. S. Mishra, J. D. Heidel, P. Webster and M. E. Davis, *Journal of controlled release*, 2006, **116**, 179-191.
27. S. H. Pun, N. C. Bellocq, A. Liu, G. Jensen, T. Machemer, E. Quijano, T. Schluep, S. Wen, H. Engler and J. Heidel, *Bioconjugate chemistry*, 2004, **15**, 831-840.
28. R. J. Mumper, J. G. Duguid, K. Anwer, M. K. Barron, H. Nitta and A. P. Rolland, *Pharmaceutical research*, 1996, **13**, 701-709.
29. S.-J. Sheu, L.-C. Chou, Y.-S. Bee, J.-F. Chen, H.-C. Lin, P.-R. Lin, H.-C. Lam and M.-H. Tai, *Experimental eye research*, 2005, **81**, 673-679.
30. X. Sun, H. Qiao, H. Jiang, X. Zhi, F. Liu, J. Wang, M. Liu, D. Dong, J. R. Kanwar and R. Xu, *Cancer gene therapy*, 2005, **12**, 35-45.
31. S. E. Cook, I. K. Park, E. M. Kim, H. J. Jeong, T. G. Park, Y. J. Choi, T. Akaike and C. S. Cho, *Journal of controlled release*, 2005, **105**, 151-163.
32. D. W. Lim, Y. I. Yeom and T. G. Park, *Bioconjugate chemistry*, 2000, **11**, 688-695.
33. B. Newland, H. Tai, Y. Zheng, D. Velasco, A. Di Luca, S. M. Howdle, C. Alexander, W. Wang and A. Pandit, *Chemical Communications*, 2010, **46**, 4698-4700.
34. D. Velasco, G. Réthoré, B. Newland, J. Parra, C. Elvira, A. Pandit, L. Rojo and J. San Román, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, **82**, 465-474.
35. H. Nguyen, P. Lemieux, S. Vinogradov, C. Gebhart, N. Guerin, G. Paradis, T. Bronich, V. Alakhov and A. Kabanov, *Gene therapy*, 2000, **7**, 126-138.
36. B. Jeong, Y. H. Bae, D. S. Lee and S. W. Kim, *Nature*, 1997, **388**, 860-862.

CAPÍTULO 5
POLÍMEROS PORTADORES DE L-PROLINA Y
SU POSIBLE APLICACIÓN COMO
CATALIZADORES DE REACCIONES
ORGÁNICAS EN AGUA

CAPÍTULO 5: POLÍMEROS PORTADORES DE L-PROLINA Y SU POSIBLE APLICACIÓN COMO CATALIZADORES DE REACCIONES ORGÁNICAS EN AGUA

1. Introducción

El uso de pequeñas moléculas orgánicas como catalizadores en reacciones orgánicas es un campo relativamente nuevo en investigación, al que se le denomina organocatálisis. Una de las aplicaciones más importantes es su uso en síntesis enantioselectiva, donde los enlaces y grupos quirales de estas moléculas usadas como catalizadores transfieren la asimetría de su estructura a los productos de reacción. Por ello, junto con la catálisis enzimática y la organometálica, es una de las principales ramas de la síntesis enantioselectiva.

Trabajos pioneros como los de Carlos Barbas III fueron los que revolucionaron el campo de la organocatálisis, donde describían reacciones aldólicas enantioselectivas, así como reacciones de Michael y de Mannich.^{1, 2} A partir de entonces, se comenzaron a utilizar numerosas moléculas orgánicas pequeñas como catalizadores quirales, entre las que destacan los aminoácidos (unidad básica de las proteínas) haciendo un intento de mimetizar la acción de los centros activos de las enzimas presentes en la naturaleza como catalizadores asimétricos de reacciones orgánicas.

Entre las ventajas del uso de los organocatalizadores en síntesis orgánica cabe destacar 1- la ausencia de elementos metálicos (usados en organometálica) que suelen ser especies bastante contaminantes para el medio ambiente; 2- suelen ser moléculas quirales accesibles a partir de fuentes naturales como único enantiómero, siendo un proceso barato y en cantidades adecuadas para reacciones de pequeña y gran escala; 3- la mayor parte son moléculas inocuas, incrementando así la seguridad del personal en los centros de investigación.

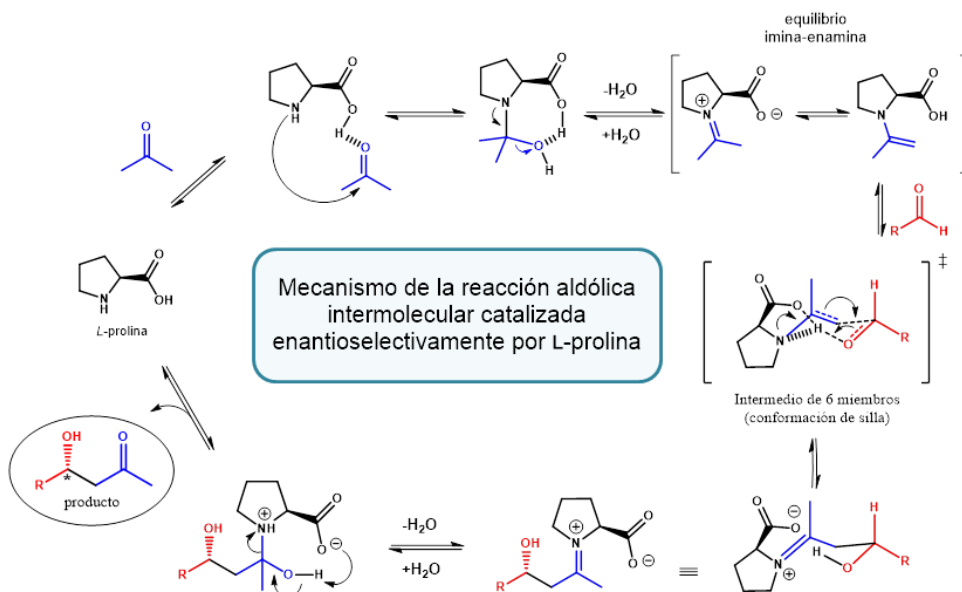
1.1. L-prolina como catalizador en síntesis orgánica asimétrica

Los aminoácidos son aquellas moléculas orgánicas que contienen un grupo amina y un grupo ácido carboxílico en su estructura. En general, los aminoácidos más importantes son los que se encuentran formando parte de la estructura de las proteínas, los cuales tienen ambos grupos sobre un mismo carbono, denominado carbono alfa. Por ello, se les denomina alfa-aminoácidos, siendo este carbono alfa un centro asimétrico (o quiral) en casi todos los aminoácidos existentes por tener cuatro sustituyentes distintos (excepto en la glicina). Este centro quiral ha servido para que los alfa-aminoácidos sean una de las especies más importantes de la organocatálisis.³

Entre los aminoácidos más importantes destaca la prolina. Se encuentra en su forma enantiomérica L-prolina en alimentos de origen animal como carnes, pescados, lácteos y huevos. También puede encontrarse en legumbres, semillas, cereales integrales, frutas, frutos secos y vegetales. Es un aminoácido natural que presenta la funcionalidad amina secundaria, presentando por tanto un pK_a superior a la de los demás aminoácidos (10.6). Por ello, la prolina actúa como

nucleófilo (grupo amina) y como ácido de Brønsted (grupo ácido carboxílico), convirtiéndose en un catalizador bifuncional.

Debido a la facilidad de encontrar este aminoácido, se ha convertido en uno de los más importantes en el campo de la catálisis enantioselectiva, tanto en su forma nativa como derivatizada.⁴⁻⁶ En el Esquema 5.1 se muestra el mecanismo aceptado actualmente para la reacción aldólica intermolecular catalizada por L-prolina para la acetona y un aldehído cualquiera. Dependiendo de los sustituyentes del aldehído y de la cetona se consiguen enantioselectividades excepcionales que se pueden explicar por la capacidad de esta molécula para articular estados de transición altamente organizados. Como podemos observar, existe un intermedio de seis miembros con conformación de silla donde se produce una transferencia de protón del ácido carboxílico al aldehído, el cual será esencial para la estabilización de la carga y la formación de los diferentes enlaces C-C del producto quiral.



Esquema 5.1: Mecanismo de reacción de la reacción aldólica intermolecular catalizada por L-prolina.

Además, cabe destacar que la presencia de agua en cantidades apropiadas en la reacción es clave para el desarrollo del ciclo catalítico completo, teniendo en cuenta que un exceso impediría la formación del equilibrio imina-enamina de la L-prolina con la cetona, y un defecto no daría lugar a su liberación para repetir de nuevo la reacción. Este aspecto será clave para el desarrollo de los catalizadores poliméricos basados en L-prolina, donde tomará especial importancia en el desarrollo de entornos hidrofóbicos que permitan llevar a cabo esta reacción en agua, sin ningún otro disolvente.

Estas reacciones aldólicas catalizadas por la L-prolina mimetizan a la perfección la actividad de las enzimas aldolasas presentes en la naturaleza, las cuales catalizan reacciones aldólicas enantioselectivas a partir de aldehídos y dihidroxiacetona fosfato.⁷

1.2. Sistemas poliméricos portadores de L-prolina

El hecho de anclar un catalizador a un soporte, ya sea polimérico o no, permite la separación del catalizador de la mezcla de reacción, facilitar el aislamiento de los productos y, lo más importante de los catalizadores: su recuperación y reciclaje.^{8, 9} Además, de alguna manera, el funcionalizar superficies o polímeros con catalizadores permite la posibilidad de obtener entornos que faciliten la reacción. Unos de los ejemplo más conocidos es el de las zeolitas,¹⁰ materiales con una estructura cavernosa regular que permite la obtención selectiva de un producto frente a otros en este caso por el impedimento estérico a formar un estado de transición u otro.

El anclaje de L-prolina a materiales de diferente naturaleza ha sido ampliamente explotado. Diversos catalizadores heterogéneos (aquellos que no son solubles en el medio de reacción) portadores de L-prolina han sido desarrollados a lo largo de la historia para reacciones aldólicas, utilizando como soporte resinas de muy diversa naturaleza.¹¹⁻¹³ También se desarrollaron catalizadores homogéneos,¹⁴⁻¹⁶ los cuales tienen la ventaja de que son solubles en el medio de reacción, facilitando así la difusión e interacción entre los reactivos de la reacción. El principal inconveniente es que se necesita una etapa adicional para el aislamiento del mismo.

En este contexto de organocatalizadores soportados, y en concreto en el de prolina soportada, un reto que se está abordando en la actualidad es el de conseguir sistemas activos en agua, mimetizando a la naturaleza y llevando a cabo las reacciones en un disolvente "verde". La L-prolina libre actúa como catalizador en medios polares, pero su eficiencia es escasa en agua a pesar de mostrar buena solubilidad.^{17, 18} Existen trabajos que han demostrado una efectiva catálisis en agua con L-prolina a través de una "activación hidrofóbica" derivatizándola con grupos hidrofóbicos, como por ejemplo anillos aromáticos,^{19, 20} o soportándola sobre materiales apolares. Un ejemplo de esto último son algunas resinas porosas hidrófobas que exhibieron excelentes propiedades catalíticas en agua, dando productos con altos rendimientos y estereoselectividad.²¹ Con estas resinas se consiguen entornos hidrófobos junto a la L-prolina activa imitando a algunas enzimas naturales, en las que generalmente existe un centro activo hidrofóbico donde se produce la reacción.

Esta "activación hidrofóbica" también tiene lugar en soportes poliméricos solubles. Recientemente se han descrito trabajos basados en copolímeros lineales solubles en agua derivados del metacrilato de hidroxiprolina y estireno, los cuales catalizan la reacción en agua con altos rendimientos, mientras que los homopolímeros sin estireno son prácticamente inactivos.^{22, 23} Este aumento de la actividad se explica por las interacciones hidrofóbicas entre el anillo fenilo del resto estireno y los reactivos, lo que confirma la necesidad de estos entornos hidrofóbicos para que se lleve a cabo la catálisis. Estos copolímeros sin estireno solo rindieron procesos enantioselectivos cuando se añadieron sales de Mg^{2+} , las cuales se cree que formaron dominios hidrofóbicos libres de agua en los que la reacción puede tener lugar de forma enantioselectiva. Esta explicación está de

acuerdo con otros trabajos recientes y con el papel controvertido del agua, la cual altera los estados de transición altamente organizados, los cuales se cree que son los responsables de la estereoselectividad.²⁴⁻²⁶ Así, Doyagüez y col. mostraron que cadenas lineales portadoras de prolina y de ciclodextrina, y efectivas en agua por activación hidrofóbica, daban reacciones enantioselectivas en el punto isoelectrico del polímero, pH en el que se formaban de nuevo agregados hidrofóbicos por compensación de cargas. En otro ejemplo, Meijer describió entidades macromoleculares unimoleculares capaces de plegarse y formar compartimentos hidrofóbicos donde se incluían las estructuras de prolina, capaces también de catalizar enantioselectivamente.²⁷

1.3. PVP como soporte de L-prolina

PVP, siendo un polímero anfílico de características en solubilidad análogas al PEG (soluble en medios polares, incluido agua, y no polares), es un candidato atractivo para ser usado como soporte homogéneo en diferentes medios polares y no polares al igual que el propio PEG,²⁸⁻³⁰ con la diferencia, ya comentada en la Introducción General de esta tesis, de que se pueden preparar sistemas polifuncionales con control de carga mediante la aproximación “*bottom-up*” usada para preparar algunos de los polímeros mencionados en el apartado anterior,³¹⁻³⁵ a diferencia del PEG que solo permite anclajes en los extremos de cadena. En esta tesis se han centrado directamente los esfuerzos en preparar soportes capaces de catalizar en agua, aunque en el futuro esta química se dirigirá a la preparación de soportes homogéneos en medios orgánicos.

Enfocando por tanto la catálisis en agua, como se ha mencionado antes la presencia cercana de anillos aromáticos puede activar hidrofóbicamente la reacción en agua.^{19, 20} En este trabajo, la derivatización de un monómero con baja activación en polimerización radical como VP va a permitir, gracias a una adecuada elección del comonómero (una maleimida aromática), la obtención de forma simple de estructuras ordenadas en las que las unidades activas de L-prolina y los grupos aromáticos se dispongan de forma alternante, maximizándose el efecto activador de los anillos. Esta alternancia obedece a la bien conocida reactividad de VP y dobles enlaces activados con sustitución 1,2 como maleimidas o maleatos.³⁶⁻³⁸ Al polimerizar ambas unidades, se obtendrán altas tendencias a la alternancia ya que macrorradicales acabados en maleimida no reaccionan con maleimidas por impedimento estérico pero sí con derivados de VP (reacción favorecida por polaridad), mientras que un macrorradical acabado en VP prefiere reaccionar con maleimida debido a la baja activación del monómero vinílico. La hipótesis de partida es que estas estructuras altamente alternantes maximicen la activación hidrofóbica y activen la reacción en agua.

Además, como se comentó anteriormente, en trabajos anteriores de diferentes grupos se ha mostrado que, además de la necesidad de una activación hidrofóbica para que la prolina catalice la reacción aldólica en agua, es requerida la exclusión del agua de las cercanías del centro activo y la formación de *pockets* hidrofóbicos para conseguir enantioselectividad en este medio. Para ello se evaluarán los sistemas en el IEP del polímero, ya que a este pH la estequiometría de cargas puede permitir la formación de complejos polielectrolíticos compactos libres de agua, de acuerdo a estudios previos del grupo de investigación donde se realizó esta tesis.³⁹ En este contexto de

formación de entidades en el IEP, en el diseño de las macromoléculas se ha incluido además la incorporación de una pequeña cantidad del macromonómero PEGMA (poli-etilenglicol metilmetacrilato) para intentar obtener en dicho IEP entidades (libres de agua) estabilizadas por las cadenas de PEG y por tanto de pequeño tamaño en las que la entrada y salida de reactivos y productos se lleva a cabo con alta velocidad. En este aspecto la hipótesis de partida es que la incorporación de una pequeña cantidad de PEGMA permitirá estabilizar coloidalmente dichas entidades manteniendo la enantioselectividad. El uso de una pequeña cantidad molar de PEGMA es requerida para mantener la tendencia a la alternancia de los otros dos componentes principales. PEGMA, a pesar de ser usado en una fracción molar baja (<10%), es un macromonómero que posee un promedio de 22 unidades oxietilénicas, es decir, capaz de estabilizar las entidades a pesar de ser usado en baja composición molar.

2. Experimental

2.1. Reactivos

El monómero de VP portador del grupo L-prolina protegida (VPcprol-Boc₂) se sintetizó como se describe en el Capítulo 1. El monómero N-fenilmaleimida (PMI) fue preparado por el grupo de Policondensación y Membranas Poliméricas, también perteneciente al ICTP-CSIC. El monómero metacrilato de polietilenglicol metiléter (PEGMA) de 1100 g/mol de Sigma-Aldrich fue utilizado sin previa purificación. El azobisisobutironitrilo (AIBN) de Sigma-Aldrich se recrystalizó en etanol. Los disolventes se emplearon sin purificación previa.

2.2. Polimerizaciones

Se llevaron a cabo cuatro copolimerizaciones de VPcprol-Boc₂ con PMI y PEGMA, manteniendo la relación VPcprol-Boc₂/PMI 1:1 pero variando la cantidad de PEGMA en las mismas; en concreto, se usaron un 0, 2, 5 y 10% molar de PEGMA, siendo la primera el copolímero binario de referencia (sin PEGMA). Todas las polimerizaciones se llevaron a cabo disolviendo los monómeros en 1,4-dioxano extra puro en una concentración total de monómero de 1 M, con AIBN como iniciador térmico en concentración de 1.5×10^{-2} M. Una vez realizada la mezcla, se burbujeó nitrógeno sobre esta disolución durante 30 minutos y posteriormente se calentó a 60 °C durante 24 horas. Los copolímeros obtenidos fueron purificados por un ciclo de precipitación-disolución-precipitación en dietiléter-cloroformo-dietiléter. Los polímeros portadores de L-prolina libre se obtuvieron mediante el tratamiento de 24 horas de los polímeros sintetizados con una disolución de ácido trifluoroacético (CF₃COOH) disuelto en CH₂Cl₂ en relación 1:1 (vol/vol). Una vez libre la L-prolina de grupos protectores, se purificaron por diálisis en agua con membranas de *cut-off* 1000 Da, seguida de una liofilización.

Las fracciones molares de las diferentes unidades monoméricas se determinaron a partir de los espectros de resonancia de los polímeros protegidos correspondientes en CDCl₃. Estos valores fueron estimados comparando el área de la banda de los protones que aparecen en el rango 7.8-6.8

ppm correspondientes a los hidrógenos aromáticos del componente PMI y el hidrógeno del grupo triazol presente en el monómero VPcprol-Boc₂, con la del grupo de señales entre 5.2-3.8 ppm (correspondiente a los hidrógenos k, p y l presentes en el monómero VPcprol-Boc₂) y con las comprendidas entre 3.8-3.3 ppm (correspondientes a la unidad repetitiva oxietilénicas del monómero PEGMA, así como el extremo metilo de la cadena), usando las siguientes ecuaciones:

$$A_{7.8-6.8} = 1H_{VPcprol-Boc2} + 5H_{PMI} \quad (\text{ec. 1})$$

$$A_{5.2-3.8} = 3H_{VPcprol-Boc2} \quad (\text{ec. 2})$$

$$A_{3.8-3.3} = 91H_{PEGMA} + 2H_{VPcprol-Boc2} \quad (\text{ec. 3})$$

$$f_{VPcprol-Boc2} = \frac{H_{VPcprol-Boc2}}{H_{VPcprol-Boc2} + H_{PMI} + H_{PEGMA}} \times 100 \quad (\text{ec. 4})$$

$$f_{PEGMA} = \frac{H_{PEGMA}}{H_{VPcprol-Boc2} + H_{PMI} + H_{PEGMA}} \times 100 \quad (\text{ec. 5})$$

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, se espera que la copolimerización radical convencional entre el monómero VPcprol-Boc₂ y PMI de lugar a un copolímero donde sus unidades monoméricas se distribuyan con una gran tendencia a la alternancia. Para confirmar esta tendencia se monitorizó por ¹H RMN in situ la reacción de copolimerización entre VPcprol-Boc₂ y PMI en DMF- d₇, en este caso con una relación molar VPcprol-Boc₂/PMI 4:3 para una mejor monitorización del consumo de ambos monómeros y comparación de la reactividad de los monómeros en ausencia de uno de ellos, en este caso de PMI. Los experimentos se realizaron en un equipo de resonancia magnética nuclear Varian 400 (400 MHz). Para realizar experimentos cuantitativos, se utilizaron las condiciones siguientes: se aplicó una secuencia de pulsos de 7 μs equivalente a un ángulo de 90° y 120 s de tiempo de retardo para asegurar que se permite la relajación total de los protones y poder procesar los datos individuales. La velocidad de giro de las muestras fue de 7 Hz. La temperatura de la muestra se mantuvo a 60°C usando un controlador de calor del equipo de RMN. Para la determinación del consumo de los monómeros se utilizó hexametildisiloxano (HMSO) como patrón externo, utilizando la relación de áreas de las señales de resonancia de los espectros obtenidos con el tiempo, usando las siguientes ecuaciones:

$$A_{7.25-7.10} = H_{VPcprol-Boc2} \quad (\text{ec. 6})$$

$$A_{7.30-7.25} = 2H_{PMI} \quad (\text{ec. 7})$$

$$\text{monómero residual (\%)} = \frac{H_{\text{monómero}}}{(H_{PMI} + H_{VPcprol-Boc2})_{a \ t=0}} \times 100 \quad (\text{ec. 8})$$

$$\text{conversión monómero (\%)} = \left[1 - \frac{H_{\text{monómero}}}{(H_{\text{monómero}})_{a \ t=0}} \right] \times 100 \quad (\text{ec. 9})$$

$$\text{conversión global (\%)} = \left[1 - \frac{H_{PMI} + H_{VPcprol-Boc2}}{(H_{PMI} + H_{VPcprol-Boc2})_{a \ t=0}} \right] \times 100 \quad (\text{ec. 10})$$

2.3. Métodos y equipos

2.3.1. Estudio de la sensibilidad al pH de los polímeros portadores de L-prolina

Se monitorizaron las regiones de solubilidad de los polímeros sintetizados mediante ensayos de turbidimetría de disoluciones acuosas de los polímeros, midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro de UV-visible Lambda 35 (Perkin-Elmer Instruments). Se utilizaron disoluciones acuosas de los cuatro polímeros preparados portadores de L-prolina libre con una concentración de 1 mg por mL de NaCl 0,15 M. Mediante un pretratamiento con un volumen pequeño de una disolución acuosa de NaOH 1M, se llevaron las disoluciones hasta pH 9.0. Una disolución acuosa de HCl 0.1 M fue utilizada para llevar a cabo la valoración usando volúmenes de 20 μ L para minimizar su efecto en la modificación de la fuerza iónica. Los cambios de pH del medio fueron medidos con un pHmetro SCHOTT® Instruments handylab pH11.

Además, se midió el tamaño de entidades en agua de los diferentes polímeros a determinados valores de pH (7.0 y 4.0) mediante medidas de dispersión de luz (DLS) en un equipo NanoZS (Malvern Instruments), así como su carga en superficie (potencial ζ), medida usando un Zetamaster system (Malvern Instruments), a una concentración de 0.5 mg/mL.

2.3.2. Evaluación de los polímeros portadores de L-prolina como catalizadores asimétricos en la reacción aldólica

Una vez sintetizados los diferentes polímeros portadores de L-prolina, se evaluó su eficiencia como catalizadores en la reacción aldólica entre el p-nitrobenzaldehído (1) y la ciclohexanona (2), donde la reacción se lleva a cabo en agua durante 24 horas, a temperatura ambiente (25 °C) y a dos pHs diferentes utilizando un tampón fosfato a pH 7.0 y 4.0 (con fines comparativos). A modo de referencia, se llevará a cabo la misma reacción con las mismas condiciones con L-prolina.

Después de las 24 horas, se añadió 1 mL de NaOH 0.2 M al bruto de la reacción y se extrajo con CH_2Cl_2 (3x1 mL). Se juntaron todas las fases orgánicas, se secaron con MgSO_4 y se eliminó el sólido por filtración simple. El disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose un residuo amarillento, el cual se disolvió en 1 mL de CH_2Cl_2 . De esta disolución final se alicuotaron 100 μ L, eliminándose el disolvente a presión reducida, y disolviendo el residuo en 1 mL de una disolución de hexano/isopropanol 4:1 (vol/vol) para HPLC. A partir de estas muestras, se calcularon la relación anti/syn así como el exceso enantiomérico de los aldoles obtenidos por cromatografía de líquidos en un cromatógrafo de alta resolución (HPLC) Dionex P680 con un detector DAD (lectura a 254 nm), utilizando una columna con fase estacionaria quiral Daicel Chiralpack AD-H, cuyos tiempos de retención (usando como fase móvil una mezcla de hexano/isopropanol 4:1 (vol/vol) con un flujo constante de 0.5 mL/min) son 23.8 (*syn*, 2S,1'S), 25.4 (*syn*, 2R,1'R), 27.3 (*anti*, 2R,1'S) y 34.6 (*anti*, 2S,1'R) minutos, aproximadamente. El tiempo de retención para el aldehído (1) es en torno a 29.5 minutos. Un ejemplo de cromatograma se muestra en el Anexo 5 (Sección 1). Para el cálculo de la relación anti/syn y el exceso enantiomérico (ee) del diastereoisómero mayoritario (2S,1'R), se utilizó la relación de áreas obtenidas del cromatograma, siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$anti/syn = \frac{A_{2S,1'R} + A_{2R,1'S}}{A_{2S,1'S} + A_{2R,1'R}} \quad (\text{ec. 11})$$

$$ee(\%) = \frac{A_{2S,1'R} - A_{2R,1'S}}{A_{2S,1'R} + A_{2R,1'S}} \times 100 \quad (\text{ec. 12})$$

Para la determinación de la conversión, se utilizó la relación de áreas de los espectros obtenidos por ^1H RMN de los brutos de reacción usando las siguientes ecuaciones:

$$A_{8.50-8.30} = 2H_{p\text{-nitrobenzaldehido}} \quad (\text{ec. 13})$$

$$A_{8.30-8.15} = 2H_{aldol(es)} \quad (\text{ec. 14})$$

$$conversión(\%) = \frac{H_{aldol(es)}}{H_{p\text{-nitrobenzaldehido}} + H_{aldol(es)}} \times 100 \quad (\text{ec. 15})$$

2.3.3. Otros métodos

Los espectros de ^1H RMN se realizaron en un espectrómetro Inova 300 (300 MHz) usando CDCl_3 o D_2O como disolvente a temperatura ambiente y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Los desplazamientos químicos se dan en escala de ppm relativos al TMS. Los espectros de ^1H RMN de la polimerización in situ se realizaron en un espectrómetro Varian 400 (400 MHz) usando DMF-d_7 como disolvente a 60°C y hexametildisiloxano (HMDSO) como referencia.

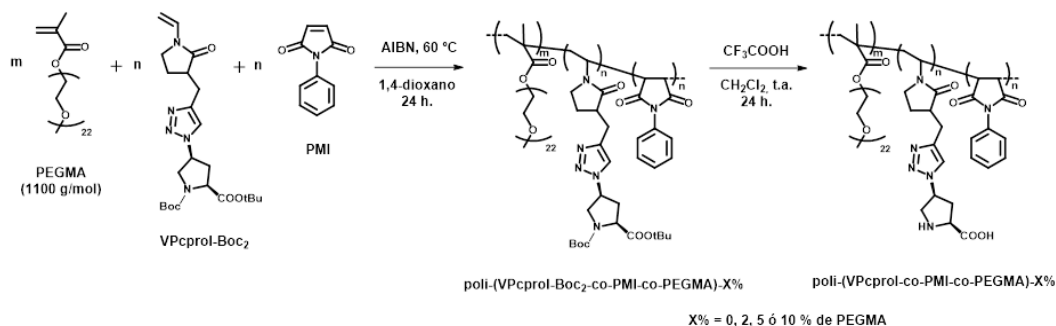
El peso molecular promedio en número (\bar{M}_n) y el índice de dispersidad (\bar{D}) de los polímeros fueron medidos por cromatografía de permeación en gel (GPC) con un sistema cromatográfico Perkin Elmer equipado con un detector de índice de refracción de Waters modelo 2414, usando columnas Styragel (300 x 7.8 mm, 5 μm tamaño nominal de partícula) HR3 y HR5 Waters. DMF con 1 % de LiBr fue usado como eluyente. Las medidas fueron realizadas a 70°C a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min, usando una concentración de polímero de 4 mg/mL. La calibración del equipo fue realizada utilizando estándares de poliestireno monodisperso de pesos moleculares del rango de 2.0 and 9000.0 kDa.

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis y caracterización de los polímeros

La estructura genérica de los copolímeros sintetizados se muestra en el Esquema 5.2. La preparación de los diferentes copolímeros estadísticos portadores del grupo L-prolina se llevó a cabo mediante la polimerización radical convencional del monómero VPcprol-Boc₂ con PMI y PEGMA (Esquema 5.2), con una fase final de desprotección del grupo activo L-prolina mediante un tratamiento con CF_3COOH . La desprotección no se puede llevar a cabo en la forma monomérica precursora debido a la labilidad del grupo N-vinilo en medios ácidos. En cualquier caso, la forma protegida hubiese sido probablemente necesaria (en caso de que se pudiese desproteger el monómero) ya que hubiese sido difícil encontrar un medio adecuado de polimerización que disolviese simultáneamente un precursor hidrofóbico y otro iónico. Los polímeros en su forma

protegida se han usado para su caracterización estructural mediante ^1H RMN, así como para el análisis de sus pesos moleculares mediante GPC. En cuanto a la forma desprotegida, que es la activa como catalizador, se ha usado para caracterizar y evaluar sus propiedades en agua.



Esquema 5.2: Procedimiento de obtención de los polímeros portadores del grupo L-prolina.

Se prepararon tres terpolímeros con diferente proporción molar de PEGMA (manteniendo la equimolaridad del derivado de VP y PMI) para evaluar la influencia de dicha carga composicional en la estabilización y actividad de los sistemas, así como un bipolímero equimolar del derivado de VP y PMI como sistema de referencia. Para analizar la mencionada tendencia a la alternancia se monitorizó una copolimerización de VPcprol-Boc₂ y PMI por ^1H RMN in situ recogiendo múltiples espectros en el transcurso de la reacción. Se usó un ligero exceso del monómero VPcprol-Boc₂ en las condiciones iniciales con el fin por una parte de facilitar el seguimiento en la reacción de copolimerización, y por la otra de comparar en un solo experimento reactividades del derivado de VP en presencia y ausencia de PMI. El consumo de VPcprol-Boc₂ y PMI en función de la conversión se determinó como se indica en la parte Experimental, siguiendo las ecuaciones 6, 7, 8, 9 y 10. La Figura 5.1 muestra las señales más representativas de los monómeros presentes en la copolimerización entre 8.5 y 7.0 ppm, en el inicio de la reacción (A) y durante la polimerización a diferentes tiempos (B). En la Figura 5.1-B se observa como las señales correspondientes a los protones pertenecientes a los dobles enlaces de ambos monómeros (x, a y a') van desapareciendo con el tiempo. En torno a las 6 horas del inicio de la polimerización, las señales a y a' pertenecientes a PMI desaparecen por completo, indicando la total incorporación del mismo a las cadenas poliméricas, quedando una pequeña cantidad del monómero derivado de VP debido al pequeño exceso que se añadió en la alimentación. Además, se puede observar como desaparecen las señales pertenecientes al protón del triazol (t) del derivado de VP y aquellos presentes en el fenilo de PMI, apareciendo sus bandas poliméricas correspondientes entre 8.1-7.8 ppm y 7.7-7.3 ppm, respectivamente. Después de las 6 horas, la polimerización avanza hasta la conversión completa de VPcprol-Boc₂; es de destacar que la velocidad de la reacción en esta fase de agotamiento del derivado de VP es muy inferior a la observada en la primera etapa de consumo simultáneo de los dos monómeros. La velocidad de reacción en la etapa de propagación cruzada entre precursores con polaridades opuestas es mucho más alta que la de la etapa de homopolimerización del derivado poco activado de VP.

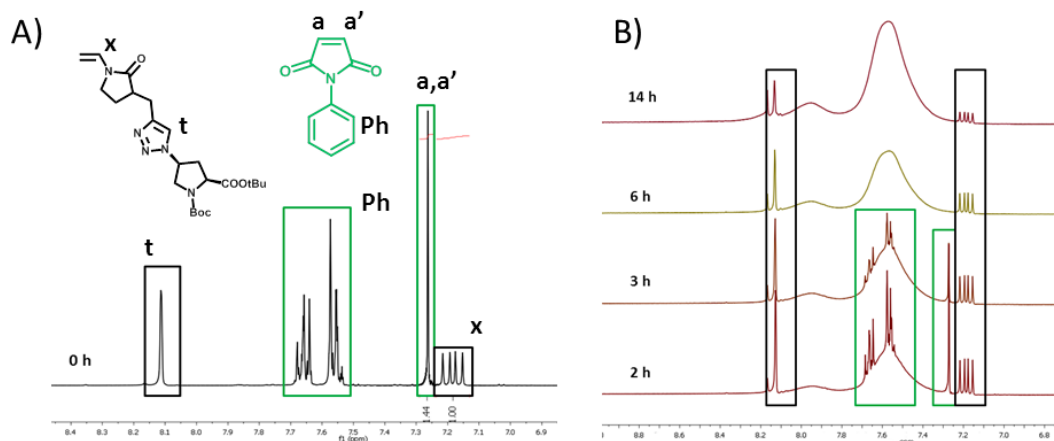


Figura 5.1: Espectros de ^1H RMN correspondientes al bruto de la copolimerización entre PMI y VPcprol-Boc₂ al inicio de reacción (A) y a diferentes tiempos (B) obtenidos en DMF-d₇ mediante monitorización *in situ* por RMN, donde se indican las señales más representativas de los monómeros PMI (color verde) y VPcprol-Boc₂ (color negro).

La gráfica de la Figura 5.2 muestra como la velocidad de consumo de los dos monómeros es muy similar a lo largo de la reacción, con pendientes en los ajustes lineales de 0.48 y 0.52 para la disminución de PMI y de VPcprol-Boc₂ respectivamente. Estos valores similares son únicamente compatibles con una alta tendencia a la alternancia de la reacción, debido a la baja activación del derivado vinílico.

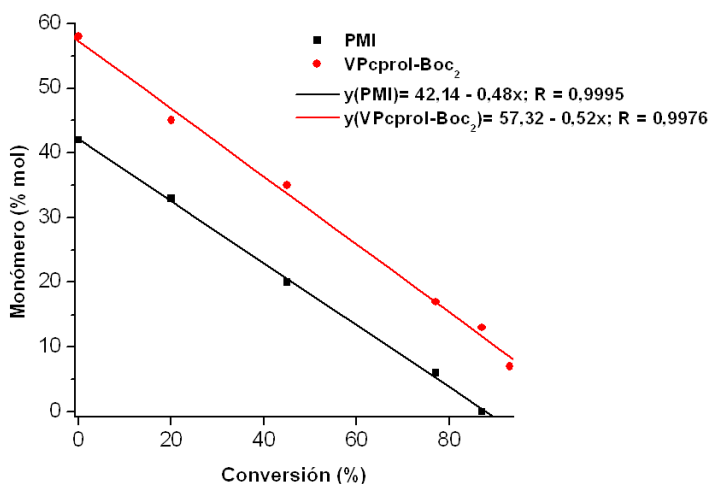


Figura 5.2: Relación molar de PMI y VPcprol-Boc₂ a lo largo de la reacción de copolimerización mediante monitorización *in situ* por ^1H RMN en DMF-d₇.

La incorporación del tercer componente PEGMA influirá negativamente en la alternancia ya que es un monómero activado que no presenta el inconveniente del impedimento estérico de PMI, de forma que cualquier macrorradical podrá reaccionar con él. Por este motivo se añade en pequeña

proporción molar para minimizar su efecto en la pérdida de la alternancia. A estos polímeros que incorporan PEGMA se les denotará como poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-X%, donde X% será el tanto por ciento molar de PEGMA añadido en la alimentación de dicha polimerización.

En la Tabla 5.1 se representan las composiciones de los monómeros VPcprol-Boc₂ y PEGMA, tanto en la alimentación (F) como en los polímeros obtenidos a conversión completa (f) para las diferentes polimerizaciones donde sólo varía la cantidad de PEGMA en la alimentación. También se muestran los datos de los pesos moleculares promedio en número y el índice de dispersidad.

Tabla 5.1: Resultados composicionales y de GPC de los polímeros obtenidos de las polimerizaciones de VPcprol-Boc₂, PMI y PEGMA a conversión total.

Polímero	F/f (VPcprol-Boc ₂) ^a	F/f (PEGMA) ^a	\bar{M}_n (kDa) ^b	\bar{D} ^b
poli-(VPcprol-Boc ₂ -co-PMI-co-PEGMA)-0%	0.50/0.50	-/-	80.8	1.7
poli-(VPcprol-Boc ₂ -co-PMI-co-PEGMA)-2%	0.49/0.47	0.02/0.02	181.8	1.6
poli-(VPcprol-Boc ₂ -co-PMI-co-PEGMA)-5%	0.47/0.46	0.05/0.06	170.3	1.7
poli-(VPcprol-Boc ₂ -co-PMI-co-PEGMA)-10%	0.45/0.45	0.10/0.09	205.0	1.8

^aCalculado por ¹H RMN. ^bDeterminado por GPC en DMF con LiBr 1% peso.

Para determinar la composición de VPcprol-Boc₂ en los polímeros se han utilizado las ecuaciones 1, 2, 3, 4 y 5 descritas en la parte Experimental, mediante la integración de las señales correspondientes en los espectros de ¹H RMN de los polímeros realizados en CDCl₃. Como se puede observar en la Figura 5.3-A, tanto el área de las bandas correspondientes a los protones aromáticos del grupo PMI y el protón del triazol (7.8-6.8 ppm) como aquellas correspondientes a los protones k, l y p del derivado de L-prolina (5.2-3.8 ppm) se mantienen prácticamente constantes en los cuatro copolímeros debido a que se mantiene la relación VPcprol-Boc₂/PMI y se incorpora una cantidad de monómero PEGMA relativamente pequeña, cuyas señales correspondientes al grupo etilenglicol (3.7-3.3 ppm) varían enormemente de un copolímero a otro debido a la cadena de PEG de \bar{M}_n 1000 g/mol presente en el monómero PEGMA. Además, la incorporación de este tercer componente a la cadena polimérica incrementa notablemente el peso molecular de los mismos debido como se indicó antes a la presencia de las cadenas laterales de PEG de 1000 g/mol.⁴⁰ \bar{D} se mantiene por debajo de 2, valores dentro de la normalidad en polimerizaciones radicales convencionales. Volviendo al análisis por RMN, cabe destacar las señales pertenecientes a los grupos terbutilo de los grupos protectores del ácido carboxílico y amina secundaria de la L-prolina presentes en los polímeros, que aparecen a 1.6-1.1 ppm. Una vez que se produce el tratamiento con CF₃COOH, estas bandas desaparecen debido a la desprotección del grupo activo de L-prolina, tal y como se muestra en la Figura 5.3-B.

Del mismo modo, se calcularon las composiciones de PEGMA. Como se puede observar en la Tabla 1, el monómero PEGMA se incorpora completamente en las cadenas. En la Figura 5.3-A se

observa cómo aumenta la banda correspondiente a los protones de la cadena de PEG (3.8-3.3 ppm) con la mayor presencia de PEGMA en el polímero.

3.2. Estudio de la sensibilidad al pH de los polímeros portadores de L-prolina en su forma desprotegida

Como ya se comentó en la introducción, la L-prolina se comporta de diferente manera dependiendo del pH en el que se encuentre, teniendo una estructura ideal para la catálisis cuando se encuentra en el punto isoeléctrico (IEP) (Figura 5.4). Esto es que tanto la amina secundaria como el ácido carboxílico de su estructura coexisten en su forma cargada en una estructura zwitteriónica o en equilibrio con la estructura neutral. El IEP de la L-prolina libre está en torno a pH 6.5.

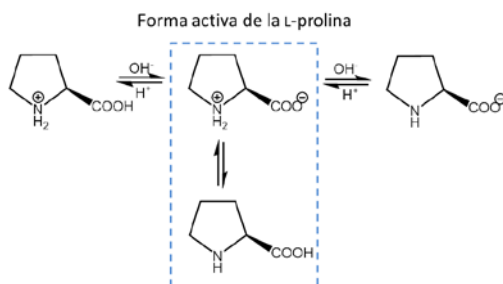


Figura 5.4: Esquema representativo de las posibles estructuras de la L-prolina en función del pH.

En nuestro caso, al ser la L-prolina un constituyente lateral de los polímeros sintetizados, se generan polizwitteriones, en un rango de pH cercano al IEP, los cuales son normalmente insolubles en medios acuosos por la existencia de una compensación de cargas. Tanto a valores de pH por encima (más básicos) como por debajo (más ácidos) habrá un exceso de cargas negativas o positivas (respectivamente) y los polímeros pueden solubilizarse.

Por ello, siguiendo el protocolo indicado en el apartado 2.3.1., se monitorizaron los cambios de solubilidad de los polímeros sintetizados mediante ensayos de turbidimetría medidos a $\lambda=600$ nm. La Figura 5.5 muestra los cambios de absorbancia de las disoluciones de 1 mg de polímero por mL de NaCl (0.15 M), donde se puede observar unos valores máximos de absorbancia para el copolímero poli-(VPcprol-co-PMI), valores que van disminuyendo conforme va aumentando el contenido de monómero PEGMMA en el polímero, no mostrándose ningún cambio de absorbancia frente a los cambios de pH en el terpolímero poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-10%, el cual tiene la mayor cantidad de PEGMMA de los polímeros analizados. Este comportamiento confirma la hipótesis de partida relacionada con el uso de PEGMA como estabilizante coloidal, ya que al aumentar la fracción molar del mismo se hace más estrecho el intervalo de pH donde es insoluble el copolímero, así como la absorbancia en este rango de insolubilidad, llegando a una total transmitancia para el sistema con un 10 % de PEGMA.

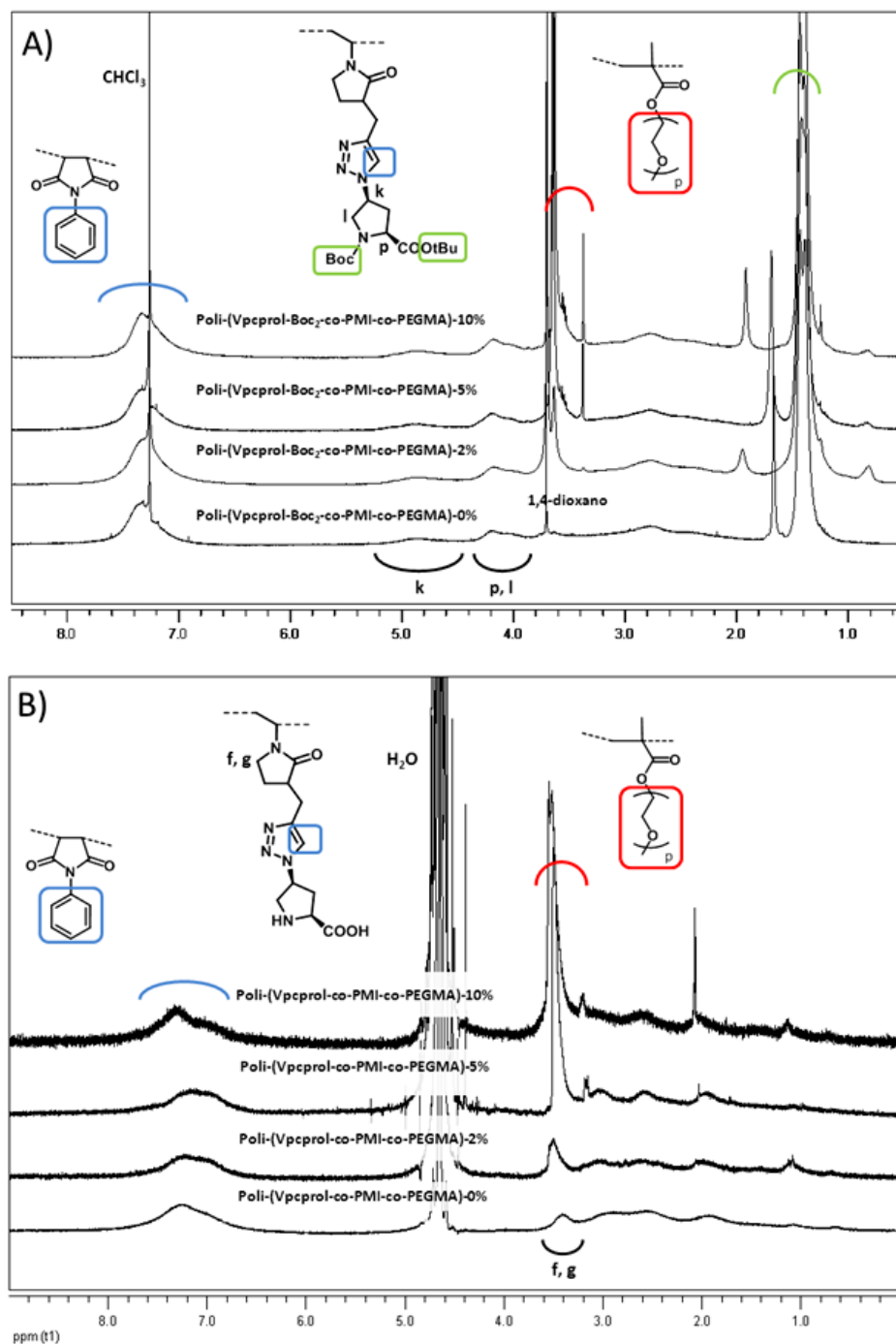


Figura 5.3: Espectros de ^1H RMN de los polímeros obtenidos portadores del grupo L-prolina protegida en CDCl_3 (A) y desprotegida en D_2O (B).

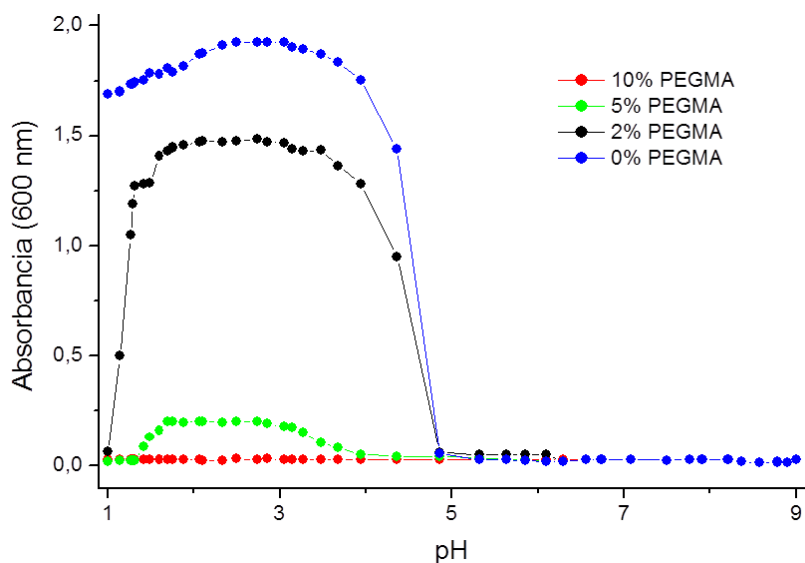


Figura 5.5: Absorbancia a 600 nm en función del pH para los polímeros sintetizados portadores de L-prolina con diferente composición de monómero PEGMA.

Si tomamos como IEP el valor de pH medio entre aquellos valores de pH donde se produce un cambio drástico de absorbancia (la disolución pasa de ser transparente a turbia, y viceversa), se obtienen valores entre 2,5-3,0, excepto para el terpolímero portador de un 10% de PEGMA que no mostró cambios significativos de absorbancia al variar el pH del medio.

Si comparamos estos valores de IEP con el de la L-prolina libre (6,5), tenemos un descenso significativo del mismo. Descenso que ha sido descrito para otros polímeros lineales.²² Este descenso debe de estar relacionado con el efecto polielectrolítico y la naturaleza macromolecular del soporte, que hace probablemente que se necesite un pH más ácido para protonar las aminas debido a interacciones entre grupos vecinos.

Para determinar el valor medio del tamaño y la carga de los agregados que se generan durante este proceso, se prepararon dos muestras de cada polímero, una a pH 7,0 y otra a pH 4,0, ajustando el pH de las disoluciones con HCl 0,1 M y NaOH 1M, y a una concentración de 0,5 mg por mL de agua. Estos pHs se han seleccionado porque han sido los usados para los estudios de catálisis, con el fin de comparar los resultados con los copolímeros de estireno previamente reportados por el grupo de trabajo (referencia 39). Los datos obtenidos de tamaño y carga se representan en la Tabla 5.2.

Los valores de carga en superficie de las entidades poliméricas disueltas en agua a pH 7,0 fueron negativos en todos los casos, con valores que varían entre -42 y -29 mV, lo que indica que el grupo funcional de L-prolina se encuentra en un pH por encima de su IEP. A este pH las entidades detectadas por DLS para los sistemas con un 0 ó un 2% de PEGMA tienen tamaños compatibles con cadenas individuales, lo cual está de acuerdo con la carga y los fenómenos de repulsión electrostática entre cadenas. Sin embargo, para los dos sistemas con un 5 y 10% de PEGMA, DLS

detecta entidades de cientos de nanómetros que no son unimoleculares. Esta anomalía es muy interesante ya que se esperarían también entidades unimoleculares por la repulsión electrostática y la estabilización estérica de las cadenas de PEG.

Al disminuir el pH a 4.0, el copolímero sin PEGMA precipita y forma agregados de gran tamaño. La carga superficial de las entidades generadas además se acercó a cero. Todo ello es compatible con la formación de grandes agregados por la complejación polielectrolítica y la cancelación de cargas por la estequiometría característica del IEP. La naturaleza hidrofóbica del comonomero IEP favorece esta precipitación. Sin embargo, los copolímeros portadores de PEGMA forman entidades de pocos nm, y estas entidades además muestran carga negativa, sobre todo los que tienen un 5 y 10 % molar de PEGMA. Parece que no solo hay un efecto estabilizador del PEGMA sino que además no se observa la estequiometría de cargas del IEP. Parece que la inclusión de PEGMA desplaza el IEP a menores pH. Esto está de acuerdo con las gráficas de absorbancia de la Figura 5.5, en las que se observa que a pH 4 los sistemas con 0 y 2 % de PEGMA están en el intervalo de precipitación mientras que los de 5 y 10% no. En cualquier caso, parece que PEGMA tiene una gran influencia en el tipo (tamaño, carga) de las entidades que se forman en el medio.

Tabla 5.2: Valores de tamaño (% número) y potencial ζ para los polímeros obtenidos a partir de VPcprol-Boc₂, PMI y PEGMA a diferente pH, en una concentración de 0.5 mg/mL.

Polímero	Tamaño (nm)		Potencial ζ (mV)	
	pH 7.0	pH 4.0	pH 7.0	pH 4.0
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-0%	5.2	(micras)	-38	-1
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-2%	10.2	15.8	-29	-6
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-5%	615.1	13.5	-41	-16
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-10%	712.4	21.2	-42	-17

3.3. Evaluación de los polímeros portadores de L-prolina como catalizadores asimétricos en la reacción aldólica.

Una vez sintetizados los polímeros portadores de L-prolina, se evaluó su eficacia como catalizadores de la reacción aldólica que se indica en la Figura 5.6 entre el p-nitrobenzaldehído (1) y la ciclohexanona (2), para dar el producto mayoritario (2S)-((1'R)-hidroxi(4-nitrofenil)metil)-1-ciclohexanona (3). Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 °C), y pH 7.0 y 4.0 en agua, ajustando el pH de la reacción con un tampón fosfato. La concentración que se utilizó fue de 100 mM de 1, usándose la cantidad correspondiente de polímero equivalente a un 30 % molar de L-prolina. La relación de los reactivos 2/1 fue de 5:1 en todos los casos. Los resultados obtenidos de

las reacciones se muestran en las Tablas 5.3 y 5.4. Como reacciones modelo, se llevó a cabo la misma reacción usando L-prolina libre en las mismas condiciones de pH y temperatura.

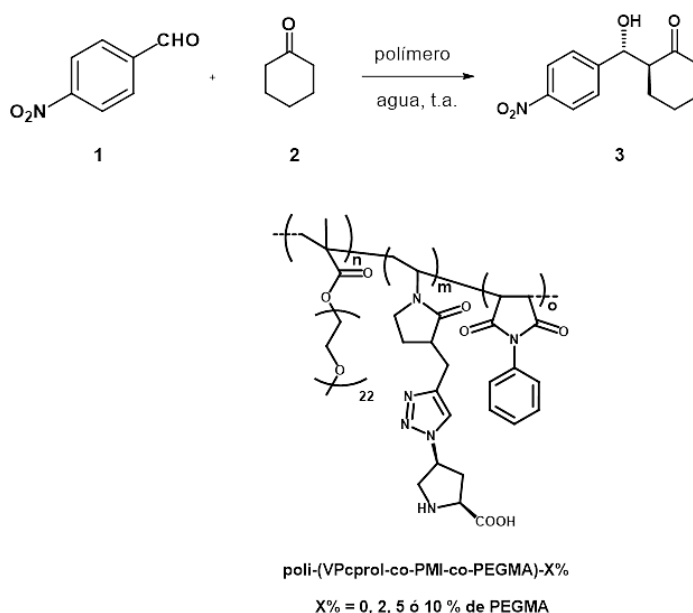


Figura 5.6: Esquema de la reacción aldólica modelo entre el p-nitrobenzaldehído (1) y la ciclohexanona (2) (arriba) para el estudio de la efectividad como catalizadores asimétricos de los polímeros obtenidos (abajo).

Como vemos en la Tabla 5.3, se obtuvieron a 24 horas y a pH 7 conversiones superiores al 90 % para todos los casos en los que se utilizó L-prolina anclada al polímero (sea cual sea su naturaleza). En cambio, cuando la L-prolina no se encuentra anclada al polímero, sólo se obtuvo un 9 % de conversión a pH 7.0. Estos resultados confirman el efecto de la unidad PMI y la activación hidrofóbica de estas unidades portadoras de un anillo aromático, que además se encuentran distribuidas con una alta alternancia. Este efecto es similar a la observada en otros sistemas similares portadores de entidades aromáticas (estirenos)²² o entidades más complejas (β -ciclodextrina).³⁹ Los resultados obtenidos de los valores de ee a pH 7.0 son siempre inferiores al 8 %, denotando una baja efectividad a la hora de transmitir la quiralidad del grupo activo. Esto puede ser debido a que, en condiciones más básicas que el IEP del polímero, los aniones a lo largo de las cadenas y su solvatación pueden causar que el agua se encuentre presente en el centro activo, probablemente influyendo en los estados de transición y la prevención de estereoselectividad.

Tabla 5.3: Resultados obtenidos de la reacción aldólica entre 1 y 2 (relación 1:5) catalizada por los sistemas indicados de L-prolina (30% molar de L-prolina respecto a 1) tras 24 horas de reacción a temperatura ambiente y pH 7.0.

Catalizador	Conv. (%) ^{a,b}	anti/syn ^b	ee (%) ^b
L-prolina	9	2.2	14
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-0%	99	1.5	2
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-2%	97	1.3	6
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-5%	96	1.6	7
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-10%	95	1.9	6

^aDeterminado por ¹H RMN. ^bDeterminado por HPLC, correspondiente al diastereoisómero mayoritario.

Tabla 5.4: Resultados obtenidos de la reacción aldólica entre 1 y 2 (relación 1:5) catalizada por los sistemas indicados de L-prolina (30% molar de L-prolina respecto a 1) tras 4 y 24 horas de reacción a temperatura ambiente y pH 4.0.

Catalizador	Tiempo	Conv. (%) ^{a,b}	anti/syn ^b	ee (%) ^b
L-prolina	24 h	0	-	-
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-0%	4 h	24	5.5	83
	24 h	91	4	81
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-2%	4 h	93	1.8	5
	24 h	93	2.5	36
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-5%	4 h	96	2	1
	24 h	96	2	27
poli-(VPcprol-co-PMI-co-PEGMA)-10%	4 h	97	1.4	3
	24 h	97	2.4	41

^aDeterminado por ¹H RMN. ^bDeterminado por HPLC, correspondiente al diastereoisómero mayoritario.

En la Tabla 5.4 se muestran los resultados obtenidos para la reacción a pH 4.0. En estas condiciones se obtuvieron conversiones a 24 horas similares a las de pH 7.0 (superiores al 90%), excepto para la reacción modelo con L-prolina libre, donde no se obtuvo reacción alguna. Sin embargo, los valores de ee a pH 4.0 se incrementan notablemente: 27-41 % en las reacciones con los terpolímeros como catalizadores, y un 81 % en la reacción con el copolímero alternante. El sistema

alternante favorece que, una vez en las proximidades del IEP de los polímeros, se produzcan las interacciones entre las cadenas por la compensación de cargas y se excluya así el disolvente, generando un entorno idóneo para la reacción aldólica, de acuerdo a resultados de trabajos anteriores del grupo. A la vista de estos buenos resultados a pH 4.0, se analizaron reacciones a 4 horas para evaluar de forma comparativa la velocidad de reacción. Cualquiera de los copolímeros con PEGMA cataliza la reacción con mucha mayor velocidad que el sistema sin PEGMA. Este hecho, además de que la enantioselectividad con los sistemas de PEGMA sea notablemente inferior, puede estar de acuerdo con una mayor presencia de agua en estos terpolímeros. La presencia del agua en la reacción impide la formación eficiente de las especies imina-enamina, desplazando el equilibrio hacia las especies iniciales (Esquema 5.1). Estos resultados también están de acuerdo con el análisis de tamaño y de carga superficial de los agregados en disolución a pH 4.0, que eran muy pequeños y más negativos para los sistemas con PEGMA, indicando una mayor facilidad para la presencia de agua.

Tras estos resultados, se llevó a cabo un estudio más exhaustivo a pH 4 de la reacción catalizada por el bipolímero alternante, que era el que presentó una mejor enantioselectividad a este pH. Se analizó cómo variaba la relación anti/syn y el ee con la conversión. Como se puede observar en la Figura 5.7-A, la reacción aldólica en este caso sigue una conversión lineal con el tiempo, llegándose a obtener un 90% de conversión a las 24 horas de reacción. Analizando la efectividad de los polímeros con la conversión, en la Figura 5.7-B se observa que la relación anti/syn va disminuyendo con el tiempo, que varía en este caso de 9 (para conversiones del 20 %) a 4 (para conversiones del 90 %). Sin embargo, el ee obtenido durante toda la reacción permanece constante (en torno al 83%). Esto puede ser debido a una posible isomerización de los productos presentes en el medio de la reacción debido a la formación de la especie enamina de los mismos.

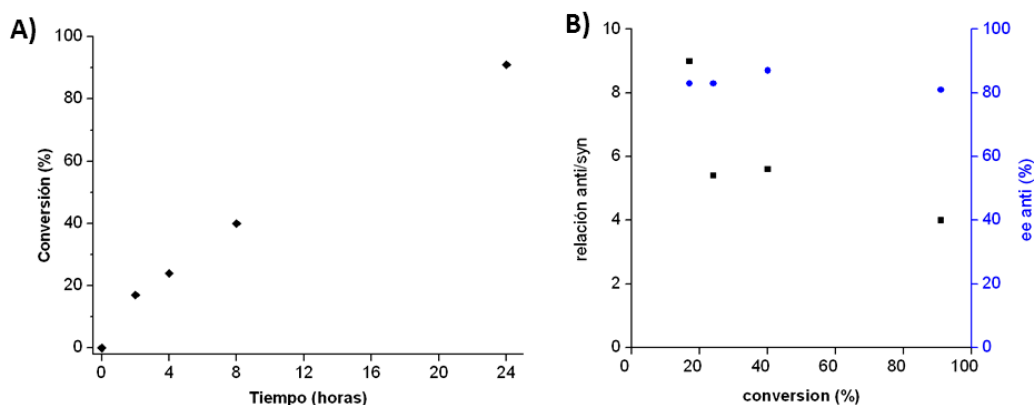


Figura 5.7: Representación de la conversión del p-nitrobenzaldehído a aldol catalizada por poli-(VPcprol-co-PMI frente al tiempo (A) y la evolución de la relación anti/syn y el ee (%) con la conversión de la misma reacción.

4. Conclusiones

Se han sintetizado con éxito copolímeros estadísticos del derivado de VP portador de prolina (VPcprol, cuya síntesis se describió en el Capítulo 1), fenilmaleimida (PMI) y una pequeño porcentaje molar de metacrilato de polietilenglicol (PEGMA). VPcprol y PMI, que se han usado en cantidades equimolares, han formado secuencias altamente alternantes de acuerdo a la monitorización *in situ* por ^1H RMN de una copolimerización de ambos. La presencia de PEGMA ha influido notablemente en el proceso de formación de agregados en las cercanías del IEP, así como en el propio valor de IEP y en la naturaleza de las entidades formadas a estos pHs, de manera que cuanto mayor es la cantidad de PEGMA, más difícil es la formación de agregados macroscópicamente visibles en las cercanías del IEP.

Se ha demostrado que la presencia de PMI en disposición altamente alternante activa la catálisis de la reacción en agua. Esta reacción no es enantioselectiva a pH 7, mientras que a pH 4 algunos sistemas muestran cierta enantioselectividad, especialmente el copolímero sin PEGMA que es el que a este pH forma agregados hidrofóbicos en los que el agua es excluida. Los copolímeros con PEGMA no forman este tipo de agregados porque a este pH no están en el IEP y no hay estequiometría de cargas, siendo también inferiores en enantioselectividad. En un futuro próximo se evaluarán los copolímeros con PEGMA a pHs inferiores en los que se dé la estequiometría de cargas (en el IEP).

5. Bibliografía

1. Y. Kakizawa, A. Harada and K. Kataoka, *Biomacromolecules*, 2001, **2**, 491-497.
2. K. Sakthivel, W. Notz, T. Bui and C. F. Barbas, *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**, 5260-5267.
3. E. R. Jarvo and S. J. Miller, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 2481-2495.
4. K. Zhu, L. Xiangzhou and Y. Shilin, *Journal of applied polymer science*, 1990, **39**, 1-9.
5. S. Beugin-Deroo, M. Ollivon and S. Lesieur, *Journal of colloid and interface science*, 1998, **202**, 324-333.
6. M. Grøtli, J. Rademan, T. Groth, W. D. Lubell, L. P. Miranda and M. Meldal, *Journal of combinatorial chemistry*, 2001, **3**, 28-33.
7. W. D. Fessner, G. Sinerius, A. Schneider, M. Dreyer, G. E. Schulz, J. Badia and J. Aguilar, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1991, **30**, 555-558.
8. A. F. Trindade, P. M. Gois and C. A. Afonso, *Chemical reviews*, 2009, **109**, 418-514.
9. M. Benaglia, A. Puglisi and F. Cozzi, *Chemical reviews*, 2003, **103**, 3401-3430.
10. S. L. Suib, *Chemical reviews*, 1993, **93**, 803-826.

11. M. R. Andreae and A. P. Davis, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 2487-2492.
12. D. Font, C. Jimeno and M. A. Pericas, *Organic letters*, 2006, **8**, 4653-4655.
13. M. Gruttadauria, F. Giacalone, A. Mossuto Marculescu, P. Lo Meo, S. Riela and R. Noto, *European Journal of Organic Chemistry*, 2007, **2007**, 4688-4698.
14. Y.-X. Liu, Y.-N. Sun, H.-H. Tan, W. Liu and J.-C. Tao, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**, 2649-2656.
15. J. D. Revell, D. Gantenbein, P. Krattiger and H. Wennemers, *Peptide Science*, 2006, **84**, 105-113.
16. M. Roberts, M. Bentley and J. Harris, *Advanced drug delivery reviews*, 2012, **64**, 116-127.
17. A. Córdova, W. Notz and C. F. Barbas III, *Chemical Communications*, 2002, 3024-3025.
18. S. S. Chimni and D. Mahajan, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 5019-5025.
19. F. Giacalone, M. Gruttadauria, P. L. Meo, S. Riela and R. Noto, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2008, **350**, 2747.
20. M. Raj and V. K. Singh, *Chemical Communications*, 2009, 6687-6703.
21. T. E. Kristensen, K. Vestli, K. A. Fredriksen, F. K. Hansen and T. Hansen, *Organic letters*, 2009, **11**, 2968-2971.
22. E. G. Doyagüez, G. Corrales, L. Garrido, J. Rodríguez-Hernández, A. Gallardo and A. Fernández-Mayoralas, *Macromolecules*, 2011, **44**, 6268-6276.
23. E. G. Doyagüez, F. Parra, G. Corrales, A. Fernandez-Mayoralas and A. Gallardo, *Polymer*, 2009, **50**, 4438-4446.
24. N. Mase, Y. Nakai, N. Ohara, H. Yoda, K. Takabe, F. Tanaka and C. F. Barbas, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**, 734-735.
25. U. M. Lindström, *Chemical Reviews*, 2002, **102**, 2751-2772.
26. S. Kobayashi and K. Manabe, *Accounts of chemical research*, 2002, **35**, 209-217.
27. T. Terashima, T. Mes, T. F. De Greef, M. A. Gillissen, P. Besenius, A. R. Palmans and E. Meijer, *Journal of the American Chemical Society*, 2011, **133**, 4742-4745.
28. R. Annunziata, M. Benaglia, M. Cinquini, F. Cozzi and G. Tocco, *Organic letters*, 2000, **2**, 1737-1739.
29. M. Benaglia, M. Cinquini, F. Cozzi, A. Puglisi and G. Celentano, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2002, **344**, 533-542.
30. M. Benaglia, G. Celentano and F. Cozzi, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2001, **343**, 171-173.

31. M. Pérez Perrino, R. Navarro, M. Gómez Tardajos, A. Gallardo and H. Reinecke, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2009, **210**, 1973-1978.
32. M. G. Tardajos, M. Nash, Y. Rochev, H. Reinecke, C. Elvira and A. Gallardo, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2012, **213**, 529-538.
33. M. G. Tardajos, L. García-Fernández, H. Reinecke, M. R. Aguilar, A. Gallardo and J. S. Román, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2012, **27**, 453-466.
34. A. del Prado, R. Navarro, A. Gallardo, C. Elvira and H. Reinecke, *RSC Advances*, 2014, **4**, 35950-35958.
35. A. del Prado, R. Navarro, P. Levkin, A. Gallardo, C. Elvira and H. Reinecke, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2015.
36. Y. Yamamoto, Y. Tsutsumi, Y. Yoshioka, H. Kamada, K. Sato-Kamada, T. Okamoto, Y. Mukai, H. Shibata, S. Nakagawa and T. Mayumi, *Journal of controlled release*, 2004, **95**, 229-237.
37. S. Iwatsuki, M. Kubo, M. Wakita, Y. Matsui and H. Kanoh, *Macromolecules*, 1991, **24**, 5009-5014.
38. J. Weiss and A. Laschewsky, *Macromolecules*, 2012, **45**, 4158-4165.
39. E. G. Doyagüez, J. Rodríguez-Hernández, G. Corrales, A. Fernández-Mayoralas and A. Gallardo, *Macromolecules*, 2012, **45**, 7676-7683.
40. B. Parrish, R. B. Breitenkamp and T. Emrick, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 7404-7410.

CAPÍTULO 6
USO DE LOS DERIVADOS DE VP AMINA PARA
LA PREPARACIÓN SIMPLE DE SISTEMAS DE
DOS COMPONENTES “AUTO-ORDENADOS”
MEDIANTE SU COPOLIMERIZACIÓN CON VP Y
METACRILATOS

CAPÍTULO 6: USO DE LOS DERIVADOS DE VP AMINA PARA LA PREPARACIÓN SIMPLE DE SISTEMAS DE DOS COMPONENTES “AUTO-ORDENADOS” MEDIANTE SU COPOLIMERIZACIÓN CON VP Y METACRILATOS

1. Introducción

Como se ha mencionado en la Introducción General, el monómero de VP pertenece al grupo de monómeros “poco activados” en polimerización radical debido a su baja velocidad de reacción. En su copolimerización con otros monómeros “más activados” como los metacrilatos usados en este trabajo, cualquiera de los macrorradicales en crecimiento es mucho más reactivo hacia la unidad metacrílica que hacia la VP. El resultado es una alta heterogeneidad composicional en reactores discontinuos, tal y como se mostraba en la Figura I.8 de la Introducción General, y se muestra en la Figura 6.1. En esta Figura se representa, para una copolimerización equimolar de VP con un metacrilato genérico M, la variación de la fracción molar instantánea del copolímero frente a la conversión. Esta gráfica se ha obtenido usando el software Copol¹ y asumiendo unas relaciones de reactividad genéricas (las del ejemplo de la literatura de la Figura 1.8 del Capítulo 1 $r_{VP}=0.12$, $r_M=6.81$,² así como que la reacción puede ser descrita por el modelo terminal³). Tal y como se ha mencionado antes y se indica en mayor detalle en el Anexo 2, el modelo terminal considera que la reactividad del macrorradical en crecimiento depende de la naturaleza de la unidad terminal y de la del monómero, y en el caso de las copolimerizaciones binarias se necesitan dos parámetros, las mencionadas relaciones de reactividad, para describir la reacción. Estas relaciones de reactividad vienen dadas por: $r_1 = k_{11}/k_{12}$ y $r_2 = k_{22}/k_{21}$, donde k_{ij} ($i,j=1,2$) es la constante cinética de la adición de un monómero M_j a una cadena en crecimiento acabada en $\sim M_i$, conocidas también como constantes de propagación cruzada, y k_{ii} o k_{jj} como constantes de homopropagación. Una relación de reactividad mayor o menor que 1 significa que la cadena en crecimiento acabada en $\sim M_1$ es más reactiva hacia el monómero 1 ó 2, respectivamente. Cuanto más cerca estén ambas de 1, menor será la reactividad diferencial en la reacción. Hay que tener presente, sin embargo, que el modelo terminal puede usarse para hacer una descripción composicional de la reacción pero es una aproximación de la realidad.⁴ En el ejemplo usado para construir la Figura 6.1, los valores de las relaciones de reactividad indican que cualquiera de los macrorradicales es mucho más reactivo hacia M que hacia VP, y por ello, la variación composicional es tan grande: primero se forman cadenas ricas en M debido a su mayor reactividad, y cuando este se consume comienzan a formarse cadenas cada vez más ricas en VP. La curva tiene una forma de función “pseudo”escalera, con la formación de dos poblaciones predominantes, una rica en M y otra en VP, lo cual explica que se observasen dos picos por cromatografía electrocinética micelar (MECK)(Figura I.8 de la Introducción General).

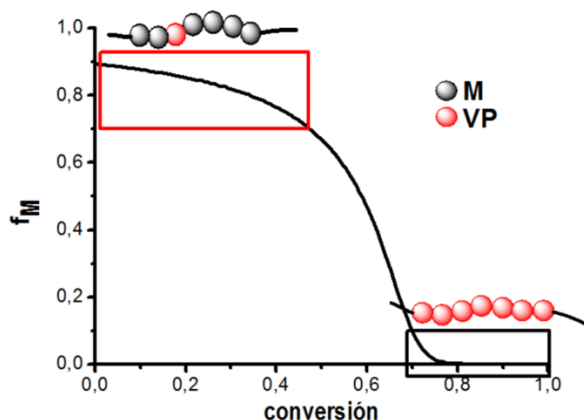


Figura 6.1: Fracción molar instantánea de M (metacrilato genérico) en el copolímero en función de la conversión para la copolimerización VP/M (1:1).

Esta formación de dos especies principales se puede ver como una “auto-ordenación” de los componentes en el propio proceso de copolimerización, el cual es muy simple, y por tanto este hecho puede ser visto como una oportunidad en química de polímeros de cara a preparar estructuras “especiales” ordenadas de dos componentes mediante una sencilla copolimerización de VP con diferentes metacrilatos. Así, en nuestro grupo de trabajo ha descrito recientemente la formación de sistemas dispersos “auto-ordenados” en la copolimerización de VP y metacrilato de metilo (MMA) en metanol.⁵ En otro ejemplo también desarrollado por nuestro equipo, se reportó la preparación de redes anfifílicas capaces de segregarse debido a su “auto-organización”, mediante la fotocopolimerización de VP y metacrilato de butilo (BMA) en presencia de entrecruzantes con funcionalidades homólogas a VP y a M.⁶ A partir de estos antecedentes, en esta tesis se han preparado sistemas dispersos con interfaces o superficies catiónicas a partir del derivado de VP con amina cuaternaria, así como redes anfifílicas con el entrecruzante hidrolizable cuya síntesis (basada en una reacción de Adición de Michael y la formación de un éster activado para la hidrólisis) se ha descrito en el Capítulo 1.

1.1. Preparación simple de interfaces y superficies catiónicas usando la VP portadora de sal de amina cuaternaria en la copolimerización “autoestabilizante” de MMA y VP

En los últimos años, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una metodología para obtener, de una manera simple y en una sola etapa de polimerización sistemas dispersos que pueden ser convertidos en microesferas. Los sistemas dispersos mencionados se obtienen mediante una copolimerización “autoestabilizante” de MMA y VP en metanol, polimerización que da lugar directamente a emulsiones líquido/líquido en las que la fase dispersa, que contiene cadenas poliméricas ricas en MMA, es estabilizada por cadenas poliméricas ricas en VP. Este resultado y el carácter “autoestabilizante” tienen su origen en dos aspectos:

- 1- La mencionada diferencia de reactividad de la VP frente a compuestos metacrílicos como MMA en polimerización radical (básicamente MMA es mucho más reactivo que VP),⁷ que hace que

una copolimerización equimolar (usada como ejemplo) forme sistemas composicionalmente heterogéneos como los descritos de forma teórica en la Figura 6.1, en los que hay una mezcla de cadenas ricas en MMA formadas al principio de la reacción y cadenas ricas en VP formadas al final.

- 2- El fenómeno UCST (*Upper Critical Solution Temperature*) que sufre el PMMA en alcoholes y que es extensible a cadenas ricas en MMA. PMMA muestra una UCST en metanol en torno a 87°C.⁸ Por debajo de la UCST, la interacción polímero-polímero es favorable frente a la interacción polímero-disolvente y se forma una fase rica en estas cadenas, es decir, se produce una separación de fases. Debido a la heterogeneidad composicional mencionada en el punto 1, en la copolimerización de MMA y VP se forman cadenas poliméricas ricas en MMA que han mostrado también este fenómeno UCST, aunque las temperaturas de transición son más bajas que para el PMMA.

Las cadenas ricas en VP, más hidrofílicas, se localizan en cambio en la fase continua. Es decir, que en una sola etapa de copolimerización se produce un ordenamiento macromolecular asociado a la heterogeneidad composicional, con la formación de dos fases y un reparto de cadenas poliméricas entre ambas fases en función de su composición. Hay que destacar finalmente que la PVP, debido a su carácter anfifílico, es un conocido surfactante polimérico, por lo que se conjetura que en el escenario de separación de fases descrito más arriba parte de las cadenas ricas en VP están localizadas en la interfaz estabilizando la fase dispersa que contiene cadenas más hidrofóbicas. En la Figura 6.2 se muestra una emulsión típica obtenida por la agitación de una copolimerización equimolar entre MMA y VP.

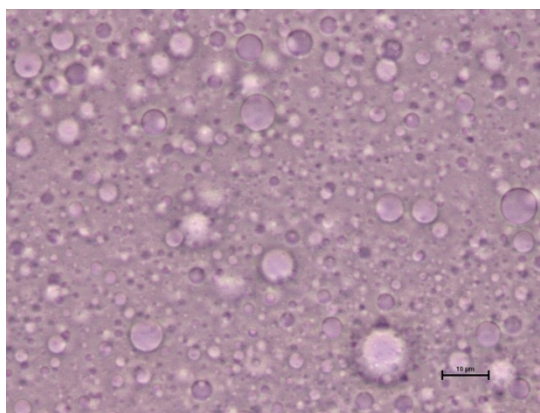
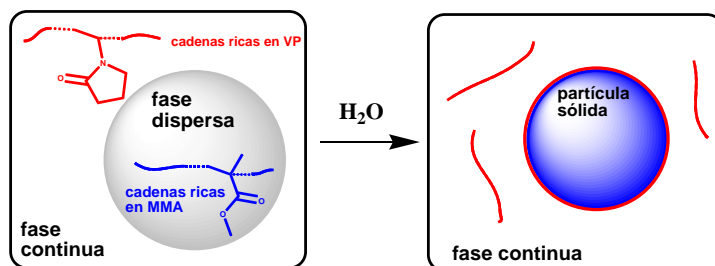


Figura 6.2: Imagen de microscopía óptica de una emulsión obtenida tras la copolimerización equimolar de VP y MMA en metanol. (Escala = 10 µm)

Estas gotas ricas en MMA se pueden considerar precursoras de partículas sólidas en medios acuosos. Tal y como se ha reportado previamente, la simple adición controlada de agua “endurece” la emulsión y forma microesferas (Esquema 6.1) con tamaños que dependen de la concentración inicial de polímero en metanol.⁹ Así, concentraciones globales de unidad repetitiva 1 ó 0.4 molar

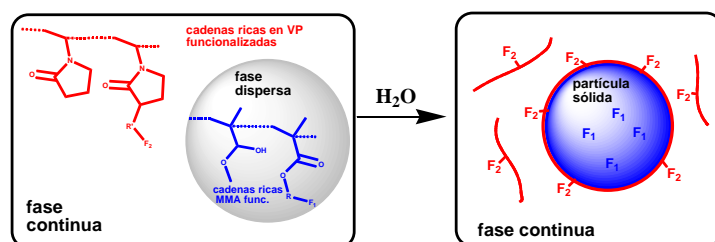
dan lugar respectivamente a microesferas por encima de la micra o submicrométricas. Es también de interés que en algunos casos se formaron microesferas con superficies nanoestructuradas.



Esquema 6.1: Esquema representativo de la emulsión líquido/líquido en metanol y de la suspensión sólido/líquido que se obtiene al añadir agua (imagen tomada de la referencia 7).

Si a la polimerización de MMA y VP en metanol que se ha discutido en el punto anterior, se le añade una pequeña cantidad de un monómero funcionalizado “homólogo” al MMA o a VP, se puede conseguir una funcionalización selectiva de las diferentes fases de los sistemas dispersos, tal y como se describió anteriormente.¹⁰ En esta tesis se ha definido como monómero “homólogo” al MMA (o a VP) a un compuesto con una reactividad en polimerización similar al MMA (o a VP), como por ejemplo otro metacrilato (o derivado de VP).

Debido a esta homología, en la copolimerización de MMA y VP los metacrilatos funcionalizados se incorporarán preferentemente a las cadenas ricas en MMA, y por tanto se localizarán mayormente en la fase dispersa de la emulsión metanólica o en el interior de la partícula sólida de las dispersiones acuosas tras el endurecimiento. Un derivado de VP en cambio se incorporará preferentemente a las cadenas ricas en VP y se localizará en la fase continua y en la interfaz, estabilizando las gotas en la emulsión o en la superficie de las partículas sólidas. En el Esquema 6.2 se representa esta funcionalización selectiva de las diferentes localizaciones y compartimentos. Hay que indicar que el porcentaje de monómero extra añadido debe de ser pequeño para que no afecte al proceso de separación de fases.



Esquema 6.2: Esquema representativo de la funcionalización selectiva de cadenas y de fases, interfaces o superficies (imagen tomada de la ref. 7).

Esta funcionalización selectiva fue demostrada mediante la incorporación de diferentes monómeros aniónicos (o anionizables) y estudiando la interacción de los sistemas dispersos con

nanopartículas magnéticas (NPs) con carga superficial positiva.¹⁰ El uso de sulfopropilmetacrilato funcionalizó selectivamente las cadenas ricas en MMA y localizó las NPs, en el interior de la fase dispersa, mientras que el uso de un derivado sulfopropilo de VP funcionalizó selectivamente las cadenas ricas en VP y guió a las NP a la fase continua y a la interfaz.

En esta tesis se ha preparado un monómero inédito, el derivado de la VP portador de una sal de amina cuaternaria, VP-N⁺ (Figura 6.3). Este nuevo compuesto permite extender el procedimiento descrito más arriba a una familia de sistemas dispersos de naturaleza catiónica ya que la inclusión de este nuevo VP permite funcionalizar con cierta selectividad las cadenas ricas en VP.

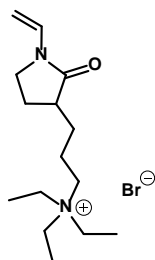
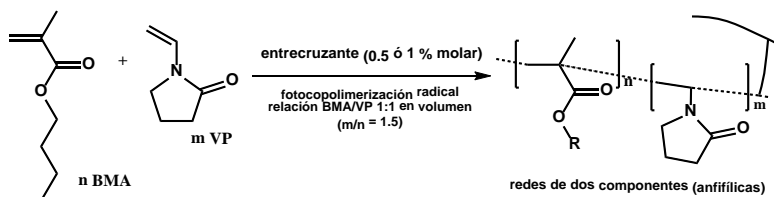


Figura 6.3: Estructura de VP-N⁺.

En este capítulo se usará esta VP funcionalizada en pequeño porcentaje (0.5 % molar frente a VP) para preparar interfaces y superficies catiónicas en sistemas dispersos ricos en MMA y estabilizados por cadenas ricas en VP. En el caso de interfaces en emulsiones metanólicas líquido/líquido, se evaluará la interacción del sistema con nanofibras de carbono (CNF), mientras que en el caso de las microesferas sólidas en agua se caracterizará su carga positiva. Sistemas sin carga, con carga negativa, o con carga positiva en estructuras metacrílicas se usarán como controles.

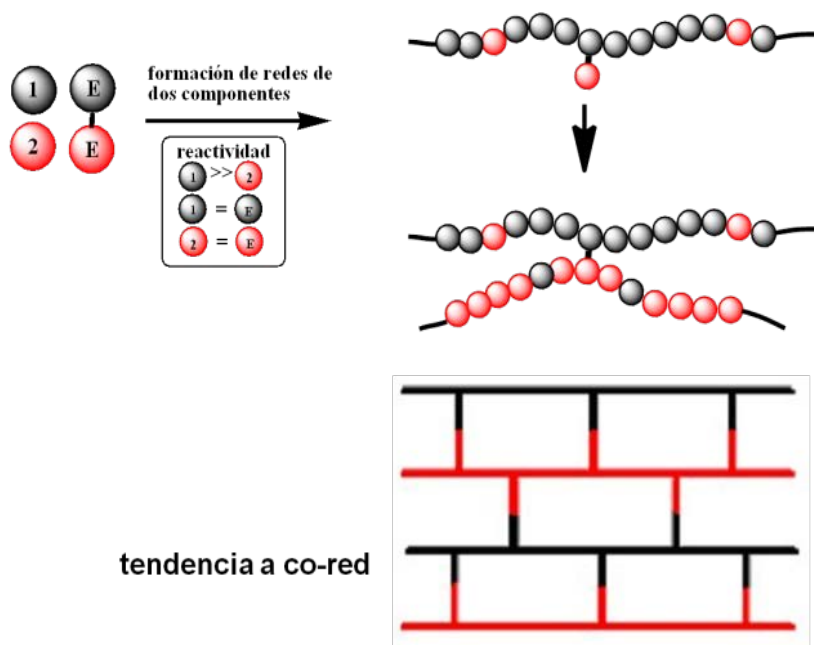
1.2. Uso del entrecruzante asimétrico hidrolizable para preparar redes anfifílicas reorganizables en agua

En el contexto de la mencionada diferencia de reactividades entre VP y la familia de los metacrilatos, Tardajos y col. describieron recientemente que la copolimerización simultánea de VP y metacrilato de butilo (BMA), en relación equimétrica y en presencia del entrecruzante asimétrico MV (Figura 6.15), rendía pseudo co-redes anfifílicas capaces de segregarse en fases, una hidrofóbica y otra hidrofílica (Esquema 6.3).⁶



Esquema 6.3: Formación de redes mediante fotocopolimerización radical.

La formación de dos tipos principales de cadenas, las ricas en BMA formadas al principio de la reacción y las ricas en VP formadas al final, permitía esta segregación, mientras que la doble homología de los grupos polimerizables de MV entrecruzaba eficazmente estos dos tipos de cadenas confiriendo una topología con tendencia a co-red, tal y como se muestra en el Esquema 6.4 y en trabajos anteriores de nuestro grupo.^{11, 12}



Esquema 6.4: Esquema simplificado de la tendencia de las topologías hacia co-red en redes de dos componentes cuando se copolimerizan ambos componentes en presencia de mezcla de entrecruzantes asimétricos bi-homólogos.

Con estos antecedentes, en este trabajo se ha sintetizado un entrecruzante asimétrico con la misma doble homología (incorporando la estructura metacrilato y la VP) pero con un espaciador hidrolizable (MVhid). Este compuesto se ha preparado tal y como se describe en el Capítulo 1, mediante la estrategia de adición de Michael de aminas sobre acrilatos (al igual que en el caso de la preparación del conjugado con fármacos hidroxilados del Capítulo 2) que se beneficia de la alta selectividad de esta reacción frente a metacrilatos, y de la activación para la hidrólisis por la amina en posición beta del éster. Se han preparado mediante fotopolimerización en masa dos redes equivolúmetricas con diferente grado de entrecruzamiento y se ha evaluado su comportamiento en medios acuosos básicos, en los que el éster activado es más sensible a la hidrólisis, usando redes entrecruzadas con MV como controles.

La hipótesis de partida es que en medio básico el éster activado por la amina en beta se hidrolizará, desapareciendo por tanto los puntos de entrecruzamiento de la red y posiblemente permitiendo la solubilización de las cadenas más ricas en VP.

2. Experimental:

2.1. Reactivos

El metacrilato de metilo (MMA) y la N-vinilpirrolidona (VP), todos ellos de Aldrich, se destilaron a presión reducida y se conservaron a -20°C (MMA) y 4°C (VP). El cloruro de (2-metacriloiloxi)etiltrimetilamina (MET-N⁺, Aldrich) se empleó sin purificación previa. El azobisisobutironitrilo (AIBN, Aldrich) se recrystalizó en etanol. La sulfopropilvinilpirrolidona (VP-SO₃⁻) se sintetizó como se describe en la literatura.¹³ La síntesis de VP-N⁺ se describe en el Capítulo 1. El 1-hidroxil ciclohexil fenil cetona (HCPK) de Aldrich, así como el resto de reactivos y disolventes se emplearon sin purificación extra.

Se usaron nanofibras de carbono (CNF, número de lote MKBS9810V de Sigma-Aldrich) con dos tratamientos en ácido nítrico diferentes. Un lote (CNF-1) se mantuvo a reflujo a temperatura ambiente en ácido nítrico (600 mg en 40 mL) con agitación durante 12 horas y posteriormente el matraz se calentó a reflujo durante 6 horas a 130°C . La suspensión se dejó enfriar, y las nanofibras se filtraron y neutralizaron con agua milliQ, con un filtro de acetato de celulosa de $0.45\text{ }\mu\text{m}$. Un segundo lote (CNF-2) se sometió al mismo tratamiento para posteriormente ser tratado con H₂SO₄/HNO₃ para reducir su tamaño. 200 mg de nanofibras funcionalizadas se añadieron a una mezcla sulfo-nítrica (H₂SO₄/HNO₃ 9 mL/3mL) y se trataron con ultrasonidos sin control de temperatura durante 7 horas. Todas las nanofibras se filtraron, neutralizaron con agua, y fueron secadas por liofilización.

2.2. Polimerizaciones

Las copolimerizaciones de MMA y VP se realizaron bajo agitación magnética por polimerización radical convencional en metanol a 60°C durante 24 horas empleando AIBN como iniciador. Las reacciones se llevaron a cabo en ausencia de oxígeno al burbujear nitrógeno durante 15 minutos antes de sellar el sistema. La concentración total de monómero e iniciador fue 1 y 1.5×10^{-2} M, respectivamente. Las copolimerizaciones se llevaron a cabo en una relación molar MMA/VP de 1:1 y 1:2.

Las redes se sintetizaron por fotopolimerización radical convencional en masa, polimerizando y entrecruzando con iniciación UV. Se mezclaron los monómeros VP y BMA en una relación de volúmenes 1:1, se añadió un 0.5 ó 1% molar frente al total de monómero del entrecruzante seleccionado y el iniciador HCPK (0.5% en peso). Se burbujearon nitrógeno en la disolución durante 15 minutos para desplazar el oxígeno en disolución. La disolución se introdujo mediante una jeringa en un dispositivo de fabricación propia formado por dos placas de polipropileno con un espaciador de silicona de $500\text{ }\mu\text{m}$. Se llevó a cabo la polimerización por irradiación de luz UV a 365 nm durante 40 minutos con una lámpara Mercury Lamp Osram HQL (250w). Las redes fueron hinchadas y lavadas con agua para extraer los precursores sin reaccionar.

2.3. Métodos y equipos

2.3.1. Emulsiones líquido/líquido y esferas sólidas

Las emulsiones obtenidas mediante copolimerización de MMA y VP (y en su caso un tercer comonomero al 0.5 % mol), y posterior enfriamiento a temperatura ambiente, se usaron tal y como fueron obtenidas, o bien se diluyeron con metanol hasta alcanzar concentraciones totales de unidades monoméricas de 1 y 0.4 M. La interacción con las nanofibras se evaluó mediante microscopía óptica. Básicamente 2 mg de CNF (1 ó 2) se añadieron bajo agitación magnética a 1 mL de emulsión termostatzada a 60 °C y previamente homogeneizada mediante agitación. Tras la adición, la mezcla se dejó enfriar bajo agitación magnética hasta temperatura ambiente. Antes del análisis mediante microscopía óptica, las mezclas se sumergieron en un baño de ultrasonidos durante 20 minutos.

Las gotas de las emulsiones de partida a 1 y 0.4 M se endurecieron por adición de agua gota a gota bajo agitación dando como resultado las partículas sólidas. Las partículas se recuperaron por centrifugación (microfuge B, Beckman) a 3000 rpm durante 30 segundos y se lavaron 3 veces con agua destilada. Tras retirar el sobrenadante las partículas se resuspendieron en agua destilada y se conservaron en este medio.

Las emulsiones líquido/líquido se caracterizaron por microscopía óptica (eclipse E400, Nikon).

Los valores de UCST de las diferentes emulsiones metanólicas se determinaron mediante turbidimetría, midiendo la transmitancia óptica de las disoluciones de copolímero en MeOH/H₂O a 600 nm en función de la temperatura. El análisis se realizó en un espectrómetro UV-visible Cary 3 BIO-Varian. La temperatura se fue reduciendo de 60 a 10 °C a una velocidad de 1 °C/min. La UCST se estimó como la temperatura en el punto de inflexión de la curva de absorbancia frente a temperatura. Para los sistemas con valores de UCST menores de 10 °C, el valor se obtuvo mediante observación óptica del punto de nube en un reactor termostatzado. Para monitorizar la variación de la UCST durante el proceso de endurecimiento (adición de agua) las mezclas se prepararon añadiendo la cantidad de agua adecuada a las emulsiones de metanol.

La carga en superficie de las partículas submicrométricas (potencial ζ) fue medida usando un Zetamaster system (Malvern Instruments).

2.3.2. Tratamiento de las redes en medios acuosos

De las redes obtenidas se troquelaron piezas cilíndricas de 20 mm de diámetro y se sumergieron en tampón fosfato de pH 8 a 60 °C, y se mantuvieron en este medio durante 3 días. Las redes entrecruzadas con MVhid aumentaron de tamaño, se volvieron blancas y mucho más flexibles que las entrecruzadas con MV, que se mantuvieron blancas o traslúcidas y sus dimensiones apenas variaron en hinchado. El aumento de área se calculó usando la ecuación

$$\text{Aumento de área} = \frac{\pi r_t^2 - \pi r_0^2}{\pi r_0^2} \times 100 \quad (\text{ec. 1})$$

donde r_0 y r_t son respectivamente los radios de las muestras a antes y después del tratamiento.

Las redes se pesaron en seco antes de sumergirlas y en hinchado tras el tratamiento. Las muestras de las redes se secaron a vacío en un Univapo 150H conectado a un Unicryo MC2L, y se analizaron gravimétricamente. El hinchamiento se determinó a partir de esta última medida y de la medida de hinchamiento usando la ecuación

$$H = \frac{m_h - m_s}{m_s} \times 100 \quad (\text{ec. 2})$$

donde m_h y m_s son respectivamente los pesos de las muestras hinchadas y secas.

2.3.3. Otros métodos

La morfología de las partículas y de las redes se estudió por microscopía electrónica de barrido (SEM) (XL30, Philips) a 25 kV. En el caso de las partículas, una gota (15-20 μL) de la suspensión de partículas se depositó en un soporte de vidrio y se dejó secar, posteriormente se metalizó con oro (Polaron SC7640, Thermo VG Scientific).

Los espectros de infrarrojos (FT-IR) fueron analizados en un equipo Perkin Elmer RX-1 con un accesorio de Reflexión Total Atenuada (ATR) usando un elemento de reflexión interna de diamante/ZnS.

La dureza Vickers de las redes se midió en un Microdurómetro tipo Vicat, a 21 °C y aplicando una carga de 4.089 N durante 25 s.

3. Resultados y discusión

3.1. Sistemas dispersos

En este trabajo se ha incorporado un 0.5 % molar de VP-N+ (con respecto a VP) a dos copolimerizaciones en metanol de MMA y VP en relaciones molares de ambos 1:1 y 1:2 respectivamente. Para ambas relaciones, se han preparado como sistemas control en el estudio de emulsiones y de obtención de interfaces catiónicas sistemas sin carga (sin VP-N+) y con carga positiva en una unidad metacrílica (usando el monómero comercial MET-N+ de la Figura 6.4).

En la Tabla 6.1 se recogen todas las copolimerizaciones llevadas a cabo. Se han etiquetado como MVxy-Z*, donde M=metacrilato, V=VP, xy=relación molar de MMA y VP (11 o 12), y Z* es la naturaleza de unidad cargada (Z=M ó V) y * el tipo d carga (+ ó -).

Los componentes usados y su composición inicial tienen una influencia dispar en los valores de UCST. Las cadenas que sufren el fenómeno de UCST son las cadenas ricas en MMA y por lo tanto cualquier variación en su composición afecta a dicho fenómeno. Un ejemplo muy claro se encuentra cuando se varía la relación de monómeros M/V en la copolimerización. Una relación molar M/V de 1:2, comparado con la reacción equimolar, hace que la composición de las cadenas ricas en MMA se enriquezca en VP (Figura 6.5), es decir, sean más hidrofílicas y presenten un menor valor de UCST,

ya que es bien conocido que un aumento de la hidrofilia disminuye la UCST.¹⁰ De igual manera una incorporación de monómero cargado (muy hidrofílico) también aumenta la hidrofilia de las cadenas y disminuye la UCST. Este efecto es mucho más acusado cuando se usa un metacrilato cargado ya que estas unidades se incorporan preferentemente a las cadenas ricas en MMA, que son las que sufren la UCST.

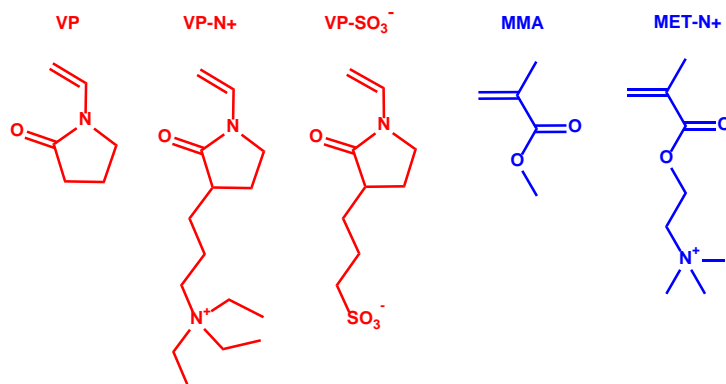


Figura 6.4: Estructuras de los componentes monoméricos usados en este estudio. Los monómeros iónicos se usaron a un 0.5 % molar con respecto a su componente principal homólogo.

Tabla 6.1: Características composicionales y valores de UCST en metanol de los sistemas estudiados.

	Relación molar de base MMA/VP	Monómero iónico usado (al 0.5 mol%)	Valor de UCST (°C) ^a
MV11	1:1	-	47
MV12	1:2	-	28
MV11-V+	1:1	VP-N+	38
MV12-V+	1:2	VP-N+	11
MV11-V-	1:1	VP-SO ₃ ⁻	46
MV12-V-	1:2	VP-SO ₃ ⁻	9
MV11-M+	1:1	Met-N+	14
MV12-M+	1:2	Met-N+	-8

^aConcentración de unidad repetitiva de 1 M. La UCST menor de 10 °C no se ha determinado por turbidimetría sino mediante observación óptica del punto de nube.

3.1.1. Interfaces positivas

Como se ha mencionado antes, y de acuerdo con los resultados previos descritos por el grupo de trabajo con monómeros aniónicos,¹⁰ la incorporación a la polimerización de un pequeño porcentaje de VP-N⁺ o de MET-N⁺ funcionalizará selectivamente las cadenas ricas en VP o en MMA (respectivamente). Como estas cadenas se compartimentalizan respectivamente en la fase continua (y en la interfaz estabilizando la emulsión) y en la fase dispersa, la funcionalización selectiva, así como la distinta localización de los dos tipos de cadenas se ha evaluado mediante el estudio de la interacción de las diferentes emulsiones 1:1 en concentración 1 M con dos tipos de nanofibras de carbono de diferente longitud (CNF-1 y CNF-2, siendo CNF-1 de mayor longitud) y con grupos superficiales anionizables (carboxilo) capaces de interactuar electrostáticamente en agua con las cargas positivas de las cadenas poliméricas. Se han elegido los sistemas 1:1 porque ofrecen separación de fases a temperaturas superiores o cercanas a ambiente, lo cual facilita este estudio. Como se puede observar en la Figura 6.6 las CNF en las emulsiones control sin carga no tienen una localización preferida, probablemente debido a la nula interacción electrostática.

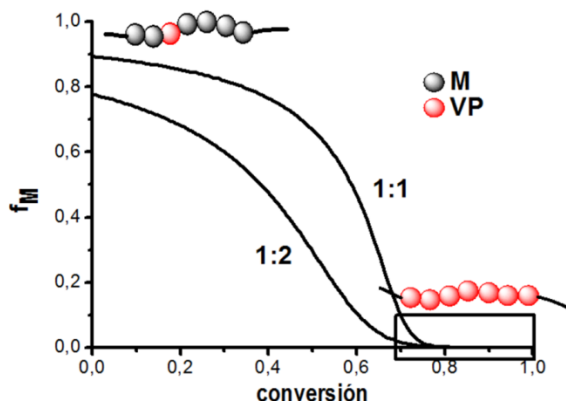


Figura 6.5: Fracción molar instantánea de MMA en el copolímero en función de la conversión para la copolimerización de MMA y VP en las relaciones molares iniciales 1:1 y 1:2.

En cambio, en el sistema MV11-V⁺, que es el que incorpora el derivado de VP portador de una sal de amina cuaternaria sintetizado en esta tesis, las dos CNFs se han localizado preferentemente en la interfaz líquido-líquido (Figuras 6.7 y 6.8), lo cual está de acuerdo con una interacción electrostática con las cadenas ricas en VP que se encuentran en dicha interfaz estabilizando dicha emulsión.

En el caso de los sistemas poliméricos portadores de unidad metacrílica positiva (MV11-M⁺), las CNFs se encapsulan en la fase dispersa (Figuras 6.9 y 6.10), lo cual está de acuerdo con una interacción electrostática con las cadenas ricas en MMA que se encuentran en dicha fase dispersa. Hay que señalar que las emulsiones en este caso muestran gotas agregadas y deformadas. La imagen de la derecha de la Figura 6.9 corresponde a una muestra no agitada en la que se observa como la fase dispersa se adapta a la posición de las nanofibras largas. Esta imagen sugiere que esta emulsión puede ser usada para preparar recubrimientos de las nanofibras.

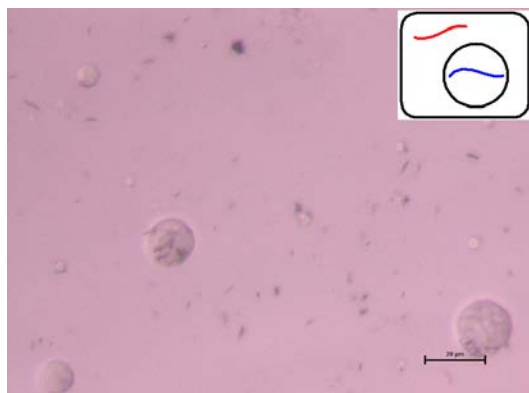


Figura 6.6: Imágenes de microscopía óptica de una emulsión MV11 cargada con CNF-2. (Escala 20 μm).

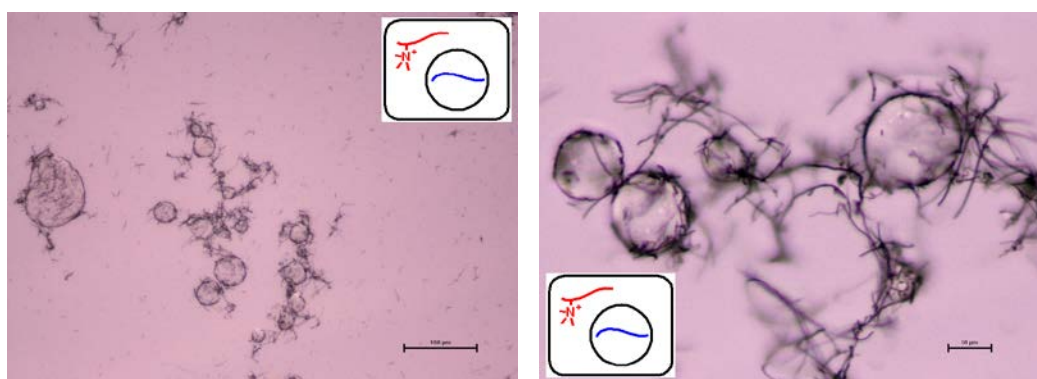


Figura 6.7: Imágenes de microscopía óptica de una emulsión MV11-V+ cargada con CNF-1. (Escala izquierda = 100, y derecha = 10 μm).

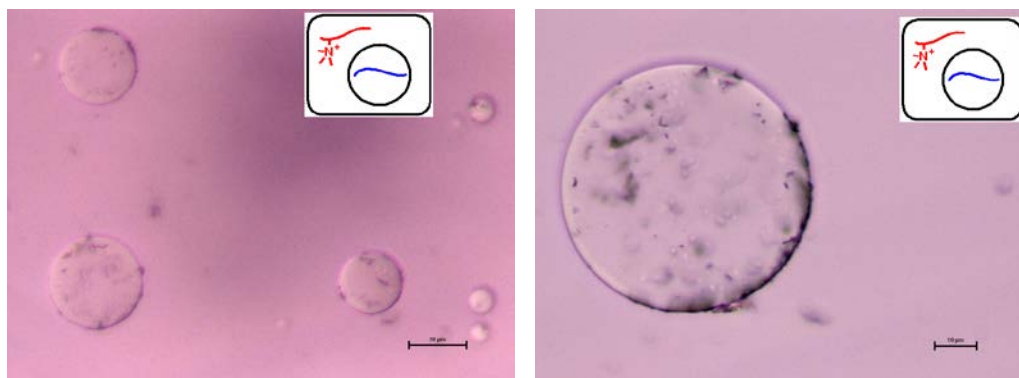


Figura 6.8: Imágenes de microscopía óptica de una emulsión MV11-V+ cargada con CNF-2 (Escala izquierda = 20, y derecha = 10 μm).

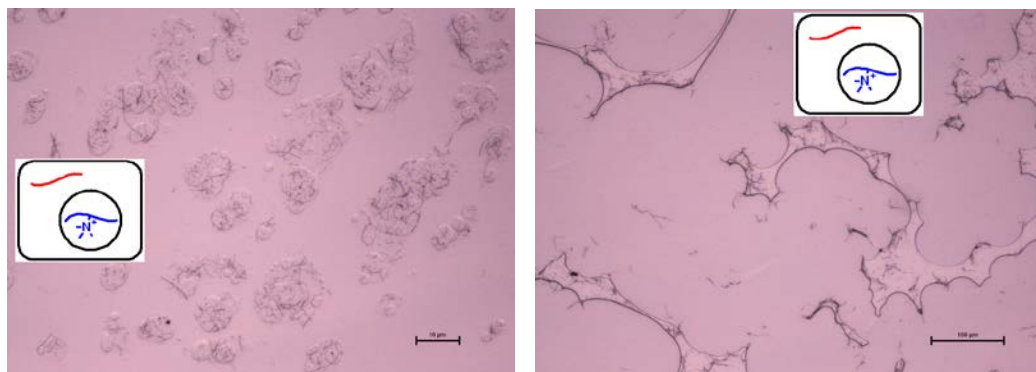


Figura 6.9: Imágenes de microscopía óptica de una emulsión MV11-M+ cargada con CNF-1. (Escala izquierda = 10, y derecha = 100 μm).

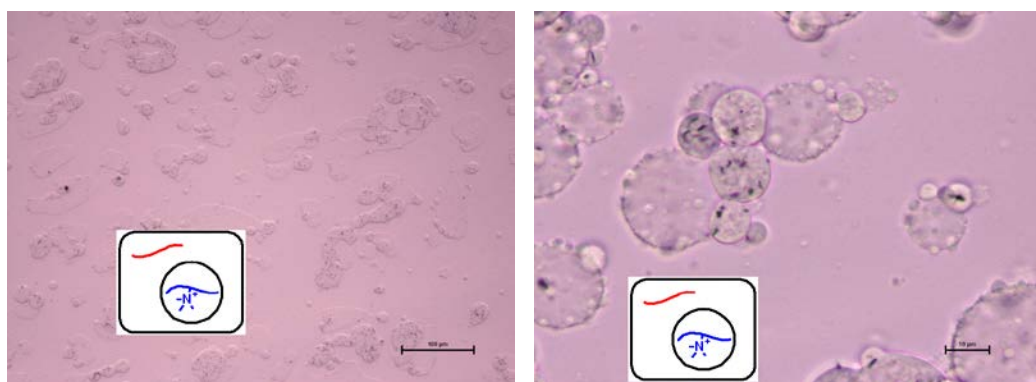


Figura 6.10: Imágenes de microscopía óptica de una emulsión MV11-M+ cargada con CNF-2. (Escala izquierda = 100, y derecha = 10 μm).

3.1.2. Superficies positivas

Las emulsiones portadoras de VP-N+ han sido endurecidas mediante adición controlada de agua. El proceso de formación de partículas es un proceso complejo en términos de variación de la UCST y de las características de la fase dispersa al ir aumentando la relación agua/metanol en el medio, ya que existe un fenómeno de cosolvencia de PMMA en mezclas metanol/agua (así como en otras mezclas de agua con alcoholes alifáticos) tal y como se muestra en la Figura 6.11 para la emulsión MV11-V+ en concentración 1M como ejemplo.^{14, 15} Aunque el agua no es un buen disolvente para PMMA, se ha descrito una solvatación preferente de las cadenas poliméricas a determinadas relaciones metanol/agua.¹⁶ Ello se refleja en el hecho de que los valores de UCST para esas relaciones metanol/agua son menores que la UCST en metanol puro, existiendo por tanto un mínimo en UCST para una relación volumétrica concreta, aquella que mejor solvata el polímero. Aunque en la mayoría de los casos el proceso de endurecimiento a temperatura ambiente mediante adición de agua atraviesa una zona de “homogeneidad” (donde la UCST en la mezcla metanol/agua está por debajo de la temperatura ambiente), el resultado final es la formación de esferas bien definidas

debido, bien a la recuperación de la emulsión líquido/líquido, bien al efecto de estabilización superficial de las cadenas ricas en VP, o bien a ambos.

En cualquier caso, y a pesar de la complejidad del proceso, éste rinde partículas esféricas de tamaño y distribución de tamaños ligeramente dependientes de la composición inicial de polímero, dependencia que ya había sido encontrada para los sistemas aniónicos o anionizables, así como para los neutros.⁹ Una concentración 1 M (las usadas en el estudio descrito en el apartado 3.1) da lugar a microesferas de tamaños promedio entre 700 nm y 2 micras (para los sistemas MV12-V+ y MV11-V+ respectivamente) y con cierta dispersidad como las de la Figura 6.12 para el sistema MV12-V+ tomada como ejemplo.

Una disminución de la concentración global de monómeros a 0.4 M da lugar a microesféras submicrométricas de tamaño menor (tamaños promedio en torno a 300-350 nm) y menor polidispersidad, como se puede observar en las Figuras 6.13 y 6.14.

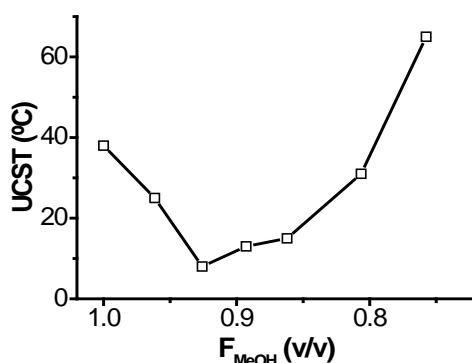


Figura 6.11: Variación de la UCST en función de la fracción en volumen de MeOH en la mezcla de MeOH/agua durante las primeras etapas del proceso de endurecimiento.

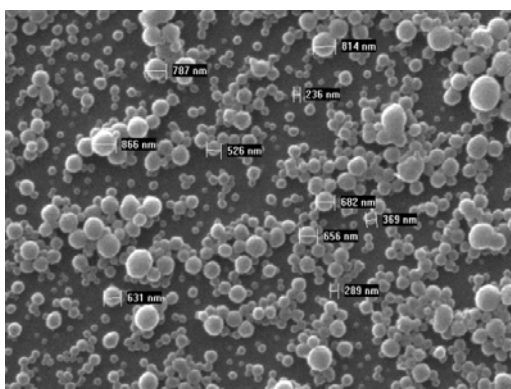


Figura 6.12: Micrografías de SEM de las partículas obtenidas tras el endurecimiento de MV12 N+ en concentración inicial de 1M.

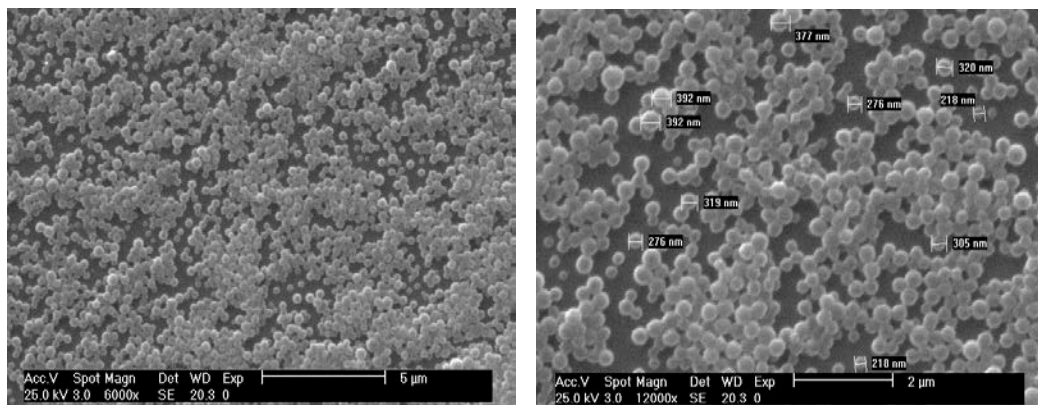


Figura 6.13: Micrografías de SEM de las partículas obtenidas tras el endurecimiento de MV12-N+ en concentración inicial de 0.4 M.

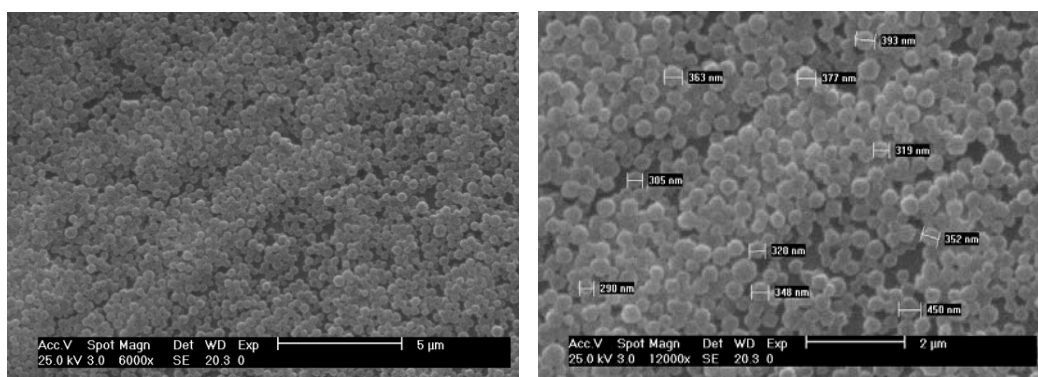


Figura 6.14: Micrografías de SEM de las partículas obtenidas tras el endurecimiento de MV11-N+ en concentración inicial de 0.4 M.

Las medidas de potencial ζ de las muestras de menor tamaño obtenidas a partir de concentraciones de 0.4 M dieron valores positivos en torno a +30 mV, lo cual confirma que las cadenas ricas en VP están en la superficie estabilizando las partículas.

3.2 Redes

De cara a facilitar esta discusión, de aquí en adelante se identificarán las redes anfífilas equivolumétricas de VP y BMA entrecruzadas con un 0.5% o un 1% molar de MV o de MVhid como redes-MV y redes-MVhid, respectivamente. Las estructuras de estos precursores difuncionales se representan en la Figura 6.15.

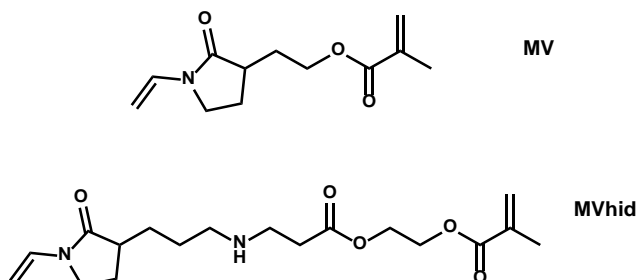


Figura 6.15: Estructura de los entrecruzantes asimétricos MV y MVhid.

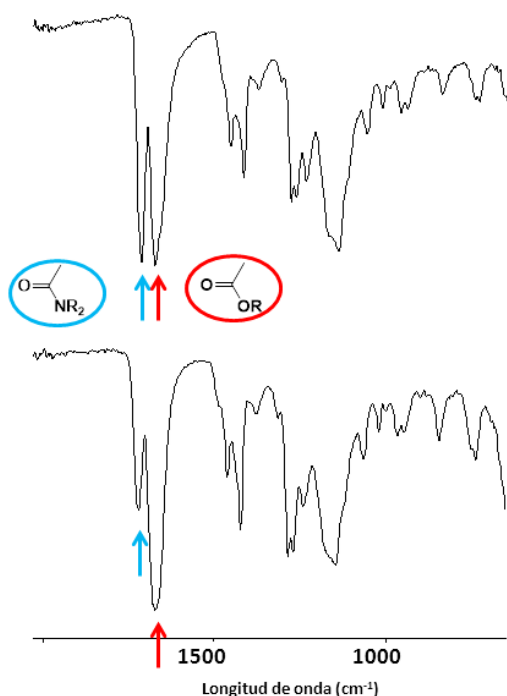


Figura 6.16: Espectros ATR de dos muestras secas tras el tratamiento en medio acuoso a pH 8. Se observan las bandas a 1725 y 1630 cm⁻¹ correspondientes a los grupos amida (azul) y éster (rojo).

Las muestras se comportaron de forma muy diferente tras el tratamiento en medios acuosos tamponados a pH 8. Las redes-MVhid aumentaron de tamaño con el tiempo, volviéndose blancas y aumentando notablemente en flexibilidad, mientras que las redes-MV se hincharon inicialmente pero apenas cambiaron de aspecto y de propiedades mecánicas con el tiempo. Un análisis estructural de la región carbonílica mediante FTIR-ATR mostró que en la red degradable (MVhid) la intensidad de la señal de la amida (1630 cm⁻¹) procedente de las unidades de la VP disminuía significativamente mientras que en la red estable no (Figura 6.16). Este cambio es compatible con la hipótesis inicial de pérdida de cadenas ricas en VP.

Este análisis debe de ser contextualizado en la variación composicional de la reacción. La relación 1:1 en volumen utilizada se corresponde con la relación molar indicada en la Figura 6.1 de VP/BMA de 1.5, y con una fracción molar de BMA (F_{M0}) en la alimentación de 0.40. En la Figura 6.17 se muestra la predicción composicional teórica de esta reacción con la conversión, representándose la fracción molar instantánea en el copolímero de BMA frente a la conversión.

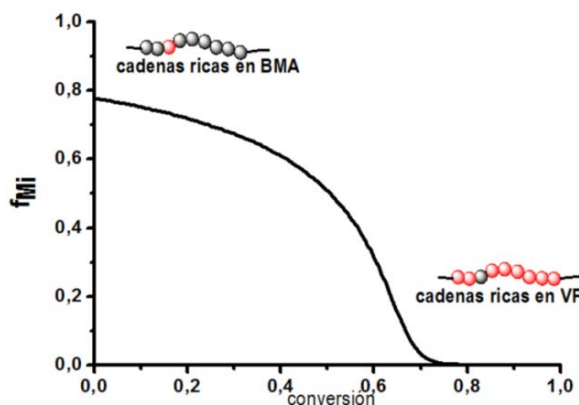


Figura 6.17: Fracción molar instantánea de BMA en el copolímero (f_{BMAi}) frente a la conversión para una copolimerización equivolúmica.

Para obtener esta gráfica se han usado las relaciones de reactividad $r_M=4.3$ y $r_{VP}=0.07$, tomadas de la literatura,¹⁷ y el programa Copol.¹ Primero se forman cadenas ricas en metacrilato (colección de cadenas que se indicarán como C_M), que de forma continua disminuyen en este componente a medida que se consume, de forma que en la etapa final se forman cadenas muy ricas en VP (colección de cadenas que se indicarán como C_V). Se observa que, comparativamente, C_V incorpora poco o muy poco monómero heterólogo (BMA) mientras que C_M incorpora de forma aproximada entre un 20 y un 50 % de VP. Es decir, que mientras que C_V se parece mucho a PVP, C_M es un copolímero con una incorporación significativa de VP. Este análisis se puede encontrar detallado en la referencia 6, donde además se calculó que la relación en volumen C_M/C_V es de 1.63, es decir, C_M es mayoritaria. En otras palabras, el balance volumétrico inicial 1:1 de monómeros en alimentación no se traduce en un balance equilibrado de C_M y C_V debido a que una parte significativa de VP se ha incorporado a C_M . La presencia significativa de VP en C_M es compatible con el análisis de ATR de las redes MV-hid, que aunque mostraban una disminución de la intensidad de la amida, aun mostraban una presencia clara de este grupo.

En la Tabla 6.2 se muestran algunas de las características de las redes tras el tratamiento. Las redes MV no degradables muestran una absorción de agua entre un 52 y un 62 % en función del grado de entrecruzamiento, y un aumento de volumen coherente con esa absorción. Las redes hidrolizables, en cambio, absorben un poco más de agua y aumentan de tamaño aproximadamente el doble. Este comportamiento está de acuerdo con una reorganización de la red tras la rotura de los puntos de entrecruzamiento y la pérdida por solubilización de las cadenas más hidrofílicas. Las

cadenas residuales son cadenas relativamente flexibles en esas condiciones (debido a que su componente hidrofóbico es BMA flexible, y que el residuo hidrofílico está plastificado por el agua) y la membrana es capaz de reorganizarse aumentando su tamaño. Las membranas hidrolizables se volvieron mucho más blandas que las no hidrolizables. Para analizar estas diferencias de dureza y de propiedades mecánicas, se llevaron a cabo medidas de dureza por el método de indentación, las cuales mostraron que las redes MVhid eran tan blandas en hinchado que la medida de la dureza Vickers estaba por debajo del límite medible.

Tabla 6.2: Características de las redes estudiadas.

	Entrecruzante (% mol)	Hinchamiento (%) ^a	Aumento de área (%) ^b	Dureza Vickers en hinchado (MPa)
Red MV	0.5	62	200	0.49 ± 0.03
Red MV	1	52	136	0.88 ± 0.03
Red MVhid	0.5	79	373	-
Red MVhid	1	80	299	-

^{a, b} Determinadas usando las ecuaciones 1 y 2 tal y como se detalla en el apartado Experimental.

La mayor absorción de agua es compatible con la formación de una estructura porosa. Para estudiar esta característica, las muestras secas se analizaron por SEM. En la Figura 6.18 se muestran micrografías obtenidas por SEM de diferentes muestras tras el tratamiento. Se observa claramente que las redes MVhid son mucho más porosas que las redes MV no hidrolizables. Esta porosidad debe de atribuirse a la pérdida de las cadenas más hidrosolubles y a la reorganización del material. Se observa también una pequeña influencia de la cantidad de MVhid en los tamaños de poro de las redes hidrolizables, siendo ligeramente mayores cuando se usó un 0.5 % (18-30 µm) frente a las del 1 % (12-20 µm).

En conclusión, la rotura en agua de los puntos de entrecruzamientos de la red preparada a partir de MMA, VP y un entrecruzante hidrolizable asimétrico con doble funcionalidad vinílica y metacrílica permite a dicha red una reorganización estructural, así como la formación de un material muy diferente al de partida, poroso y con módulo menor.

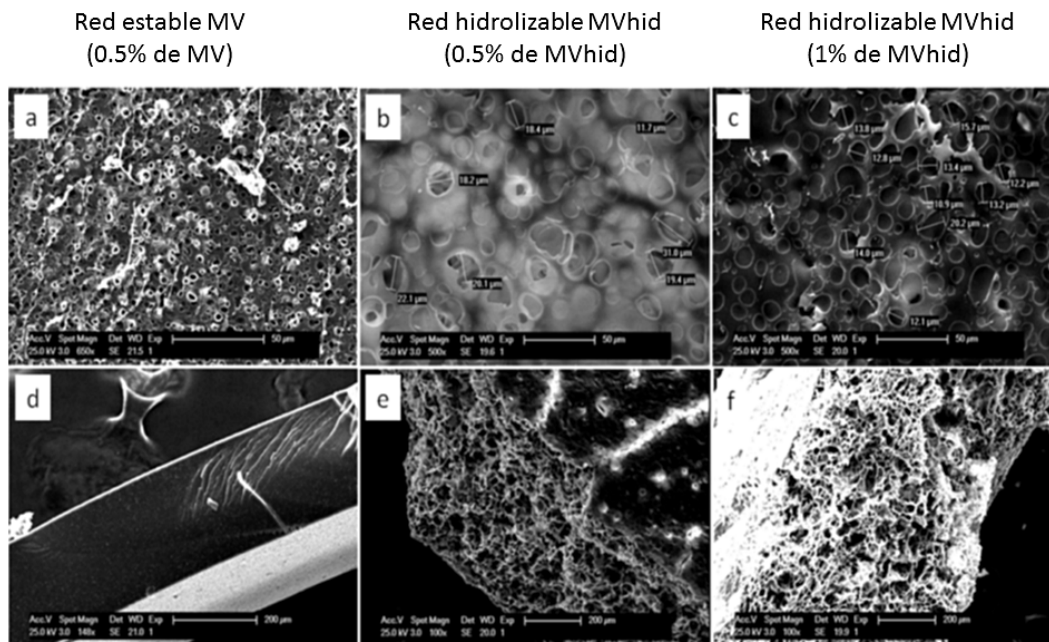


Figura 6.18: Micrografías SEM de redes MV y MVhid tras el tratamiento en agua básica. Las imágenes superiores corresponden a las superficies mientras que las inferiores a los cortes transversales. (Escala imágenes superiores = 50 µm, y de imágenes inferiores 200 µm).

4. Conclusiones

Dos de los compuestos preparados por primera vez en esta tesis han servido para obtener nuevos materiales de dos componentes “auto-ordenados” basados en VP y metacrilatos. Así, en primer lugar, a las superficies e interfaces de los sistemas dispersos autoestabilizantes ya descritos en la literatura que se obtienen tras la copolimerización de MMA y VP en metanol, se les ha conseguido conferir carga positiva mediante la incorporación de una pequeña cantidad del monómero VP portador de una sal de amonio cuaternaria. La presencia de carga en las interfaces en las emulsiones se ha demostrado mediante la interacción de dichas emulsiones con nanofibras de carbono portadoras de grupos carboxílicos anionizables.

En segundo lugar, el uso de un entrecruzante asimétrico hidrolizable ha permitido obtener redes anfífilas capaces de reorganizarse estructuralmente en medio acuoso debido a la rotura de los puntos de entrecruzamiento y a la solubilización de cadenas hidrofílicas ricas en VP.

5. Bibliografía

1. R. N. Copol, *J. Chem. Educ.*, 2004, **81**, 1210-1215.

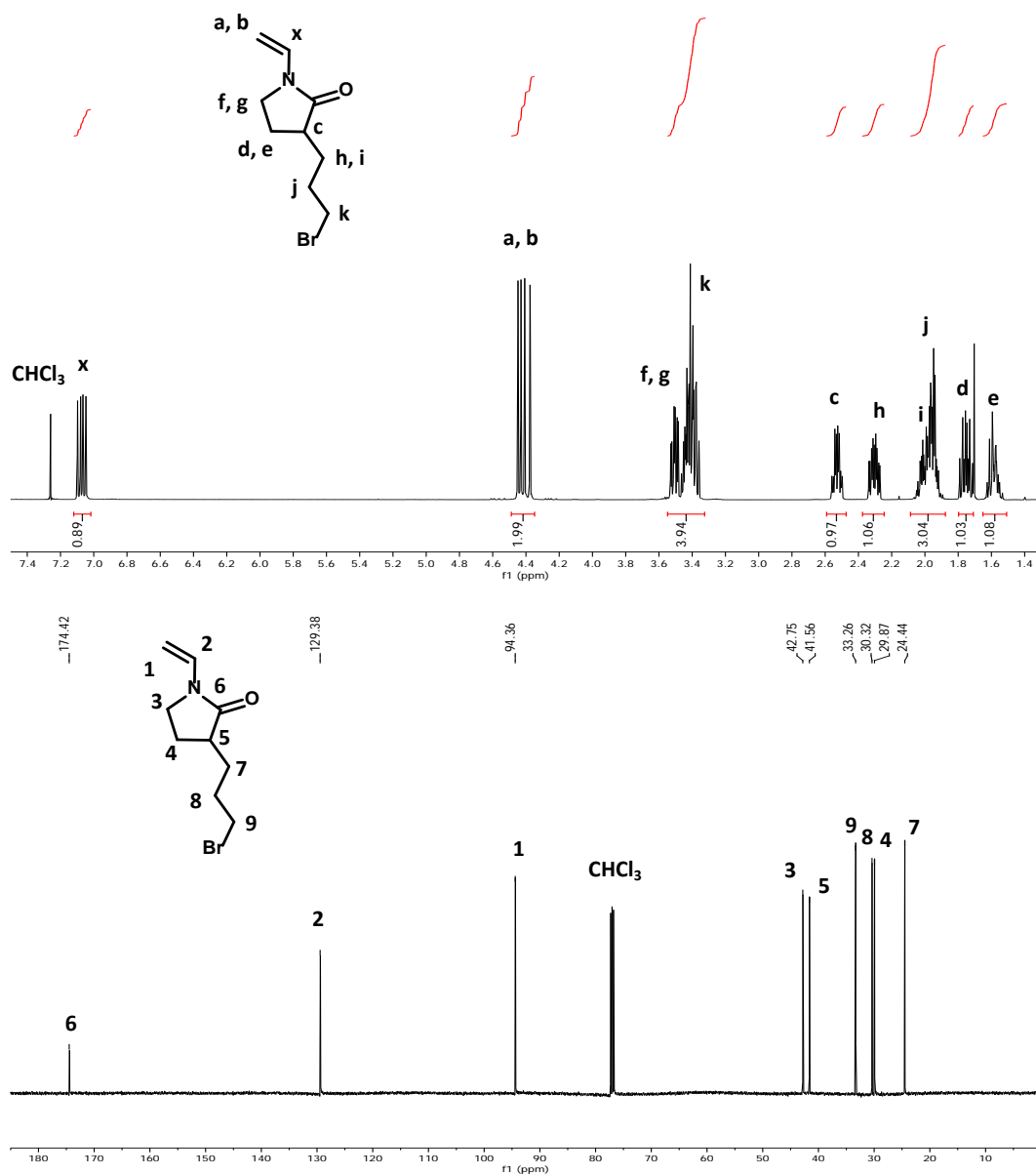
2. M. Aguilar, A. Gallardo, J. San Román and A. Cifuentes, *Macromolecules*, 2002, **35**, 8315-8322.
3. F. R. Mayo and F. M. Lewis, *Journal of the American Chemical Society*, 1944, **66**, 1594-1601.
4. M. Coote and T. Davis, *Progress in polymer science*, 1999, **24**, 1217-1251.
5. I. Aranaz, H. Reinecke, C. Elvira and A. Gallardo, *Polymer*, 2011, **52**, 2991-2997.
6. M. G. Tardajos, I. Aranaz, M. n. Pérez, D. López, H. Reinecke, C. Elvira and A. Gallardo, *Macromolecules*, 2013, **46**, 5018-5025.
7. M. G. Tardajos, M. Nash, Y. Rochev, H. Reinecke, C. Elvira and A. Gallardo, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2012, **213**, 529-538.
8. J. M. Cowie, I. McEwen and M. Garay, *Polymer communications*, 1986, **27**, 122-124.
9. M. G. Tardajos, *Universidad Complutense de Madrid*, 2013.
10. M. G. Tardajos, I. Aranaz, F. Sayar, C. Elvira, H. Reinecke, E. Piskin and A. Gallardo, *Langmuir*, 2012, **28**, 5555-5561.
11. H. Reinecke and A. Gallardo, *Macromolecular theory and simulations*, 2009, **18**, 25-29.
12. D. Demirgöz, R. Navarro, M. Pérez, H. Reinecke and A. Gallardo, *Journal of applied polymer science*, 2010, **115**, 896-900.
13. M. P. Perrino, R. Navarro, M. G. Tardajos, A. Gallardo and H. Reinecke, *European Polymer Journal*, 2010, **46**, 1557-1562.
14. J. Cowie, I. McEwen and M. Garay, *Polym. Commun.*, 1986, **27**, 122-124.
15. R. Hoogenboom, C. R. Becer, C. Guerrero-Sanchez, S. Hoeppener and U. S. Schubert, *Australian Journal of Chemistry*, 2010, **63**, 1173-1178.
16. J. M. G. Cowie, M. A. Mohsin and I. J. McEwen, *Polymer*, 1987, **28**, 1569-1572.
17. B. Reddy, R. Arshady and M. George, *European Polymer Journal*, 1985, **21**, 511-515.

ANEXOS

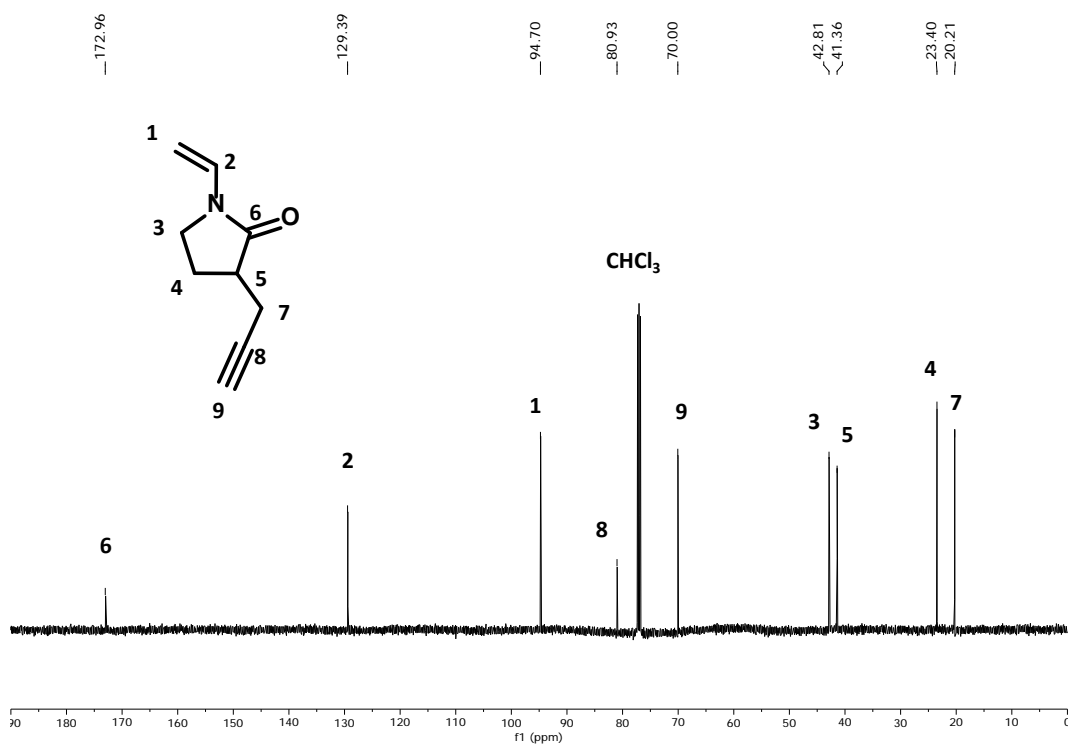
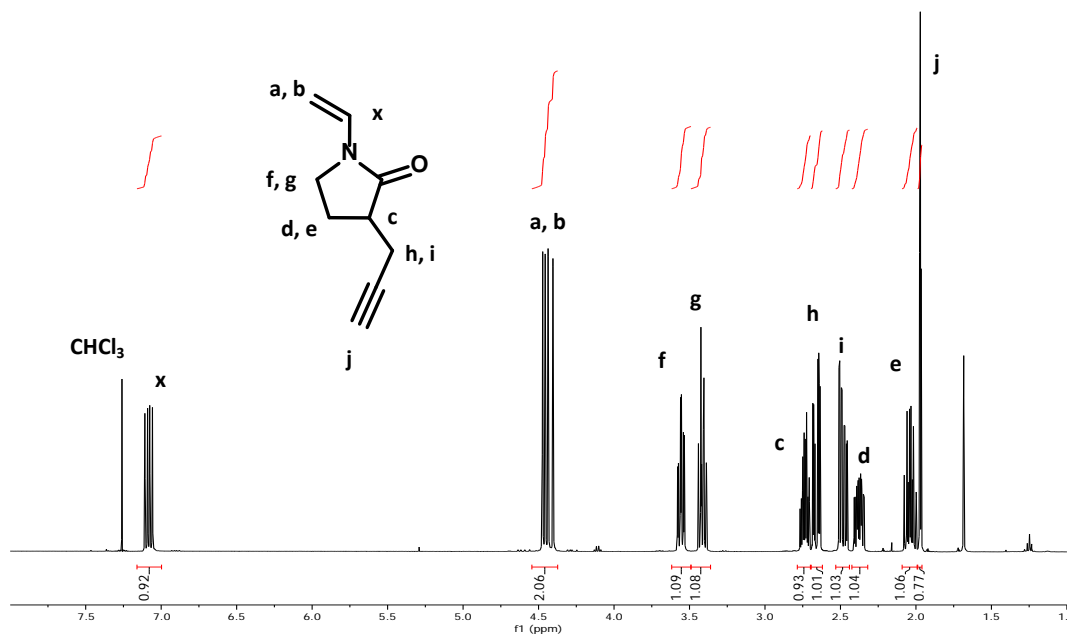
Anexo 1

Sección 1.1. Espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN de los derivados de N-vinil-2-pirrolidona cuya síntesis está descrita en el Capítulo 1.

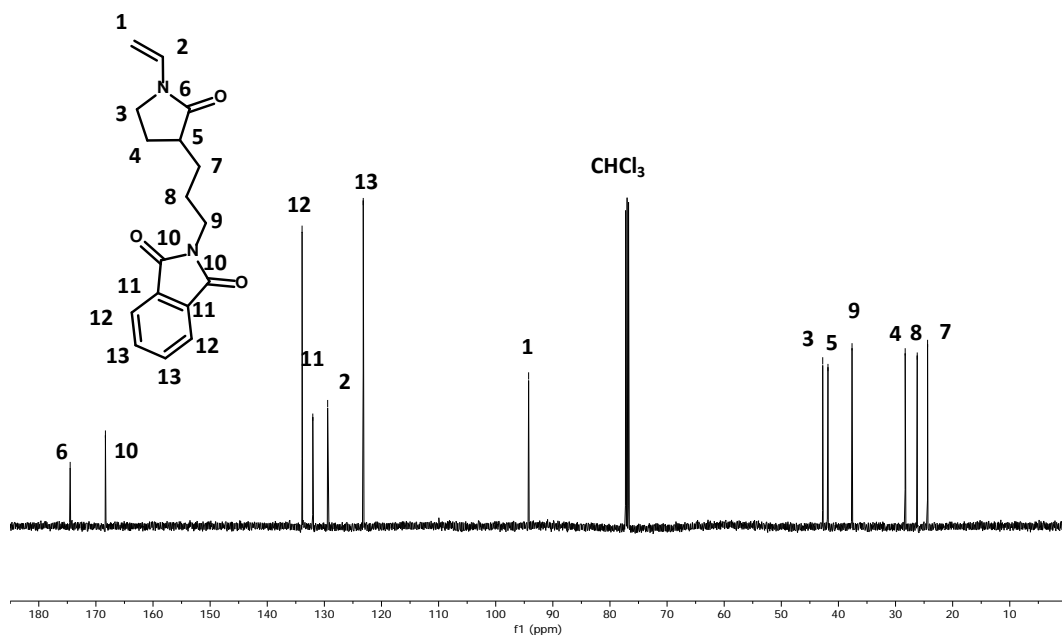
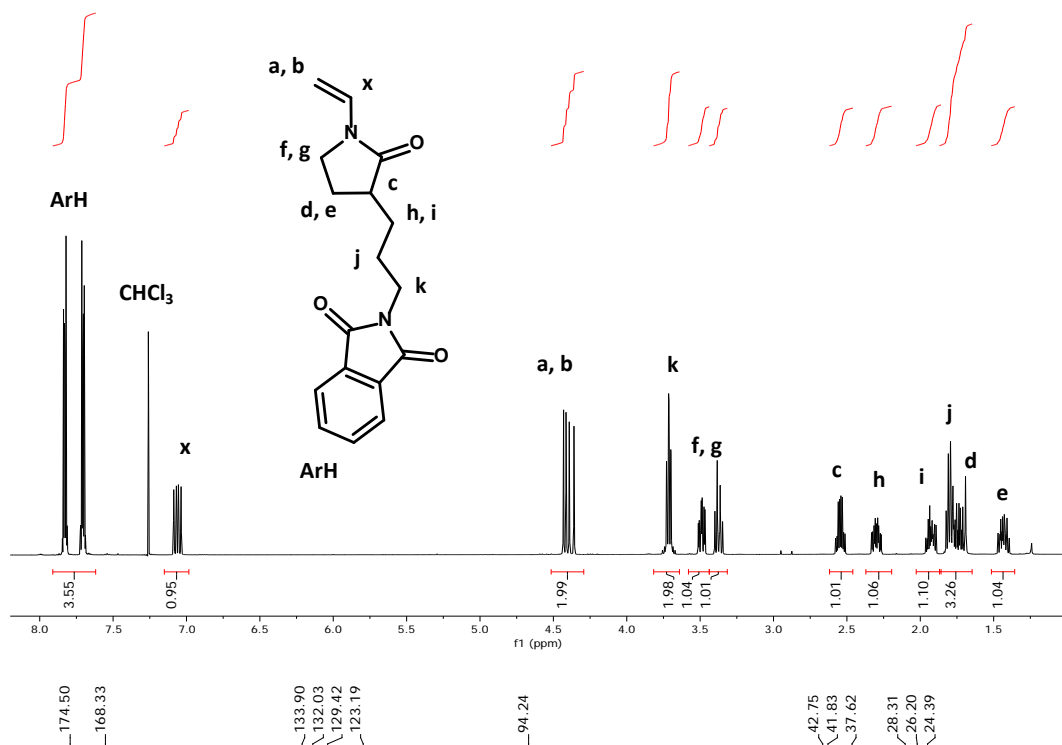
3-(3-bromopropil)-1-vinil-2-pirrolidona (VPBr)



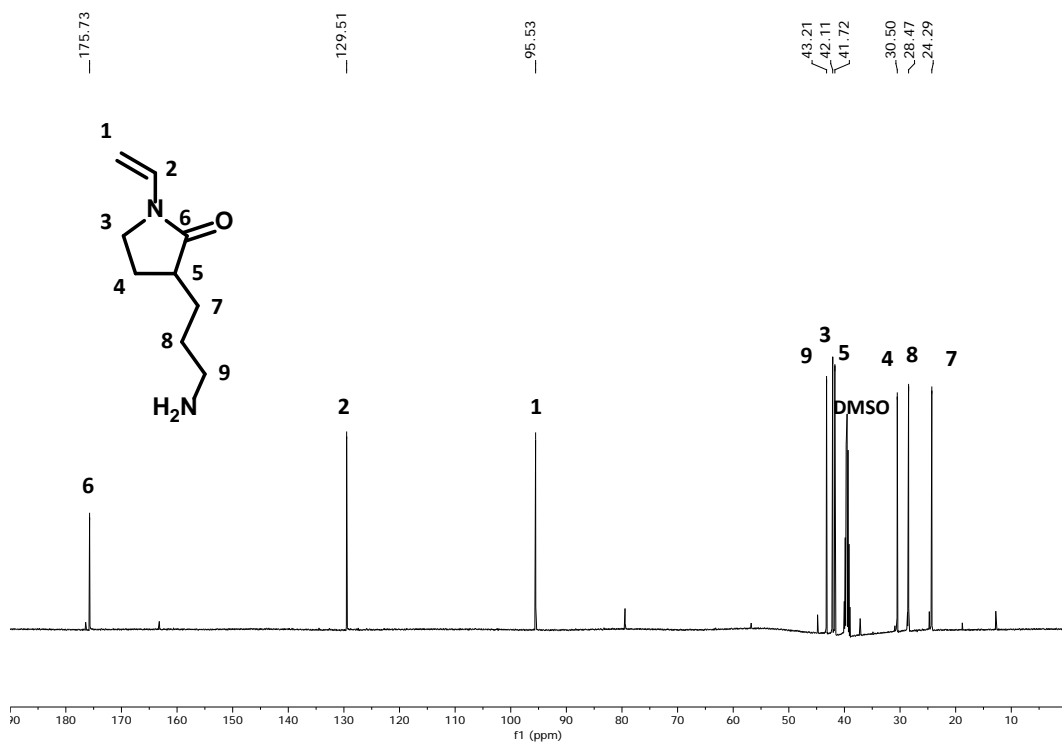
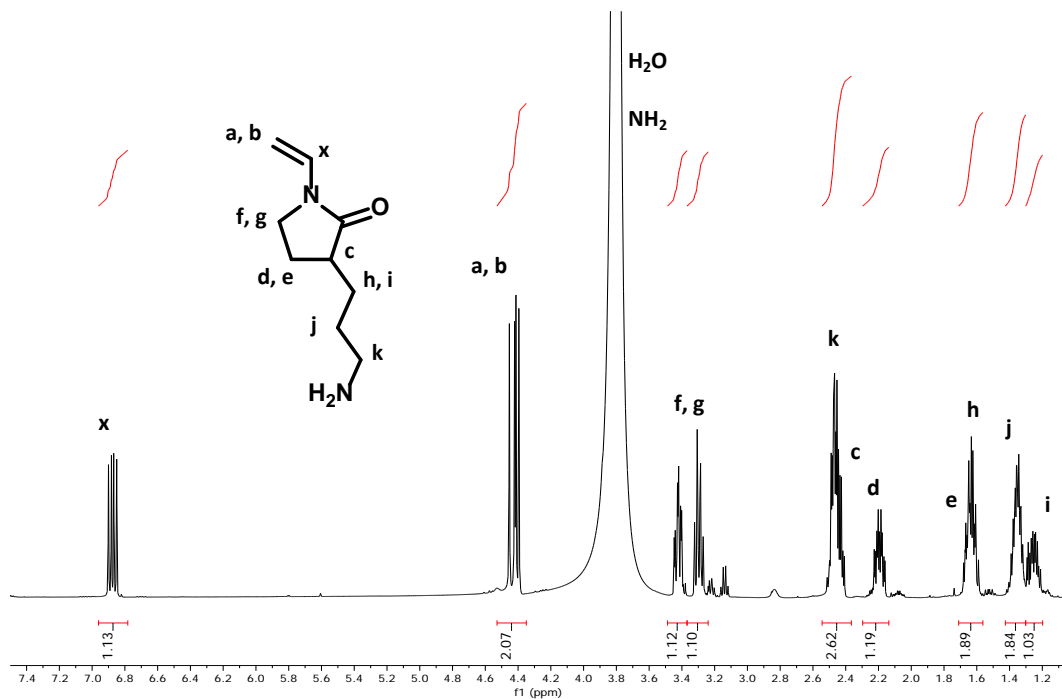
3-propargil-1-vinil-2-pyrrolidona (VP-gyl)



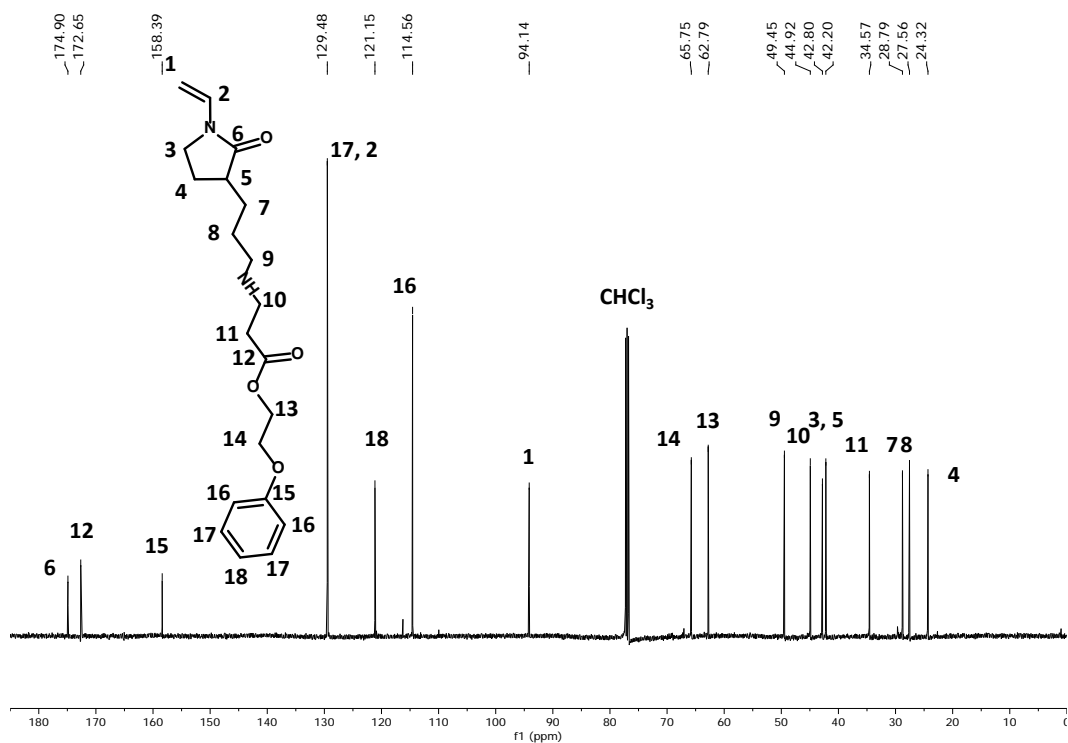
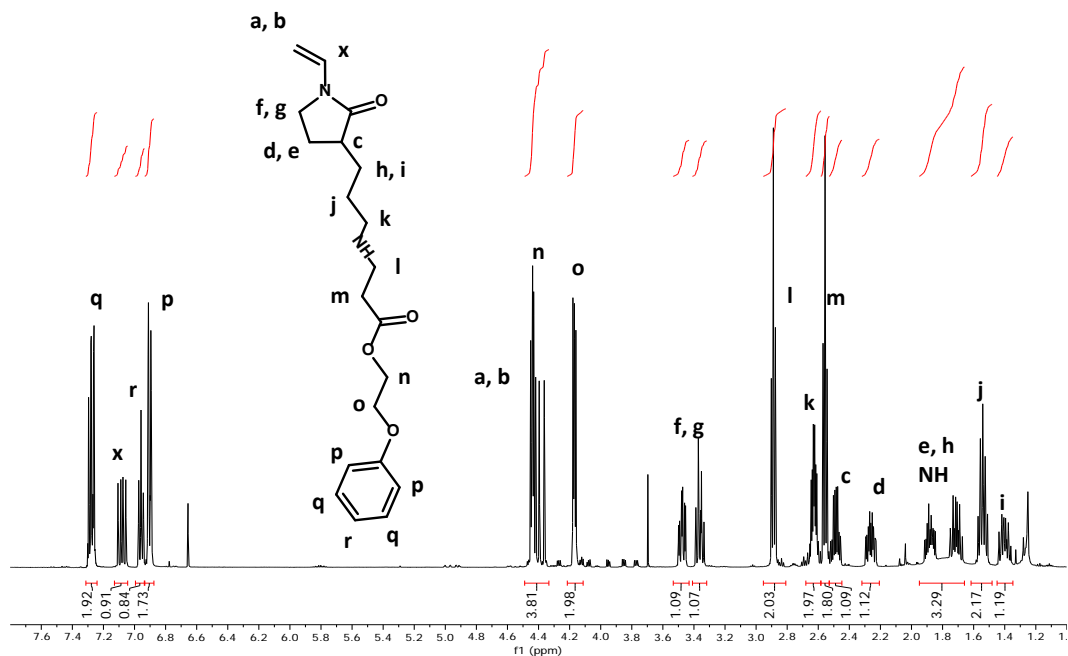
3-(3-ftalimidopropil)-1-vinil-2-pirrolidona (VPPha)



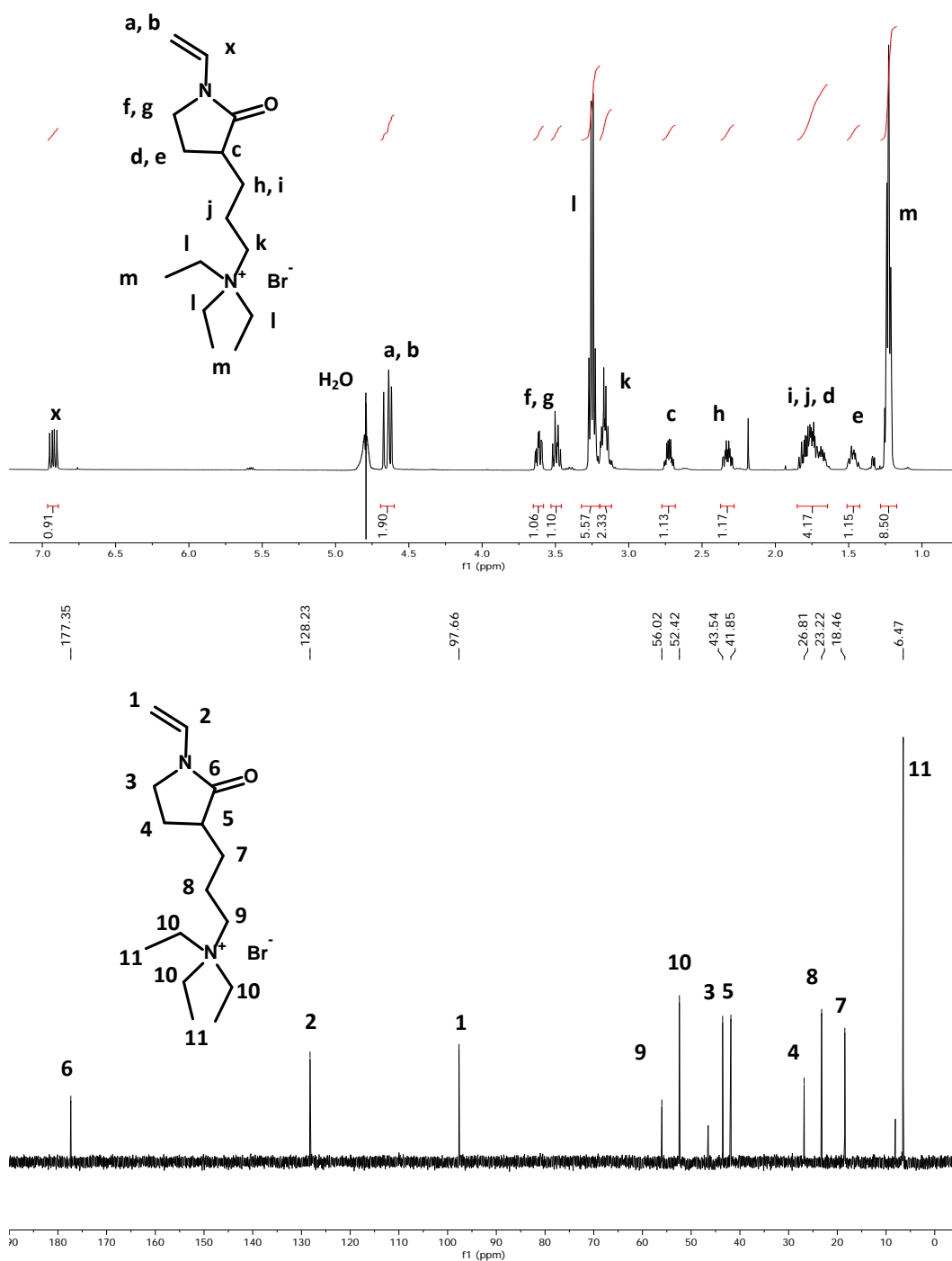
3-(3-aminopropyl)-1-vinyl-2-pyrrolidona (VPNH₂)



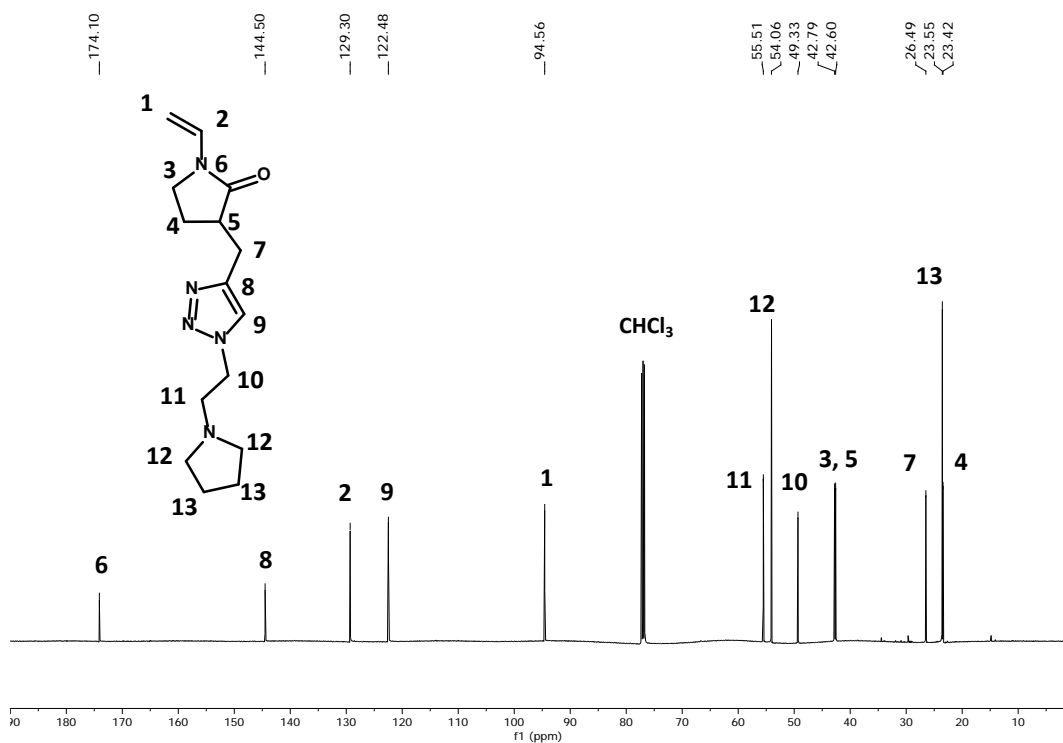
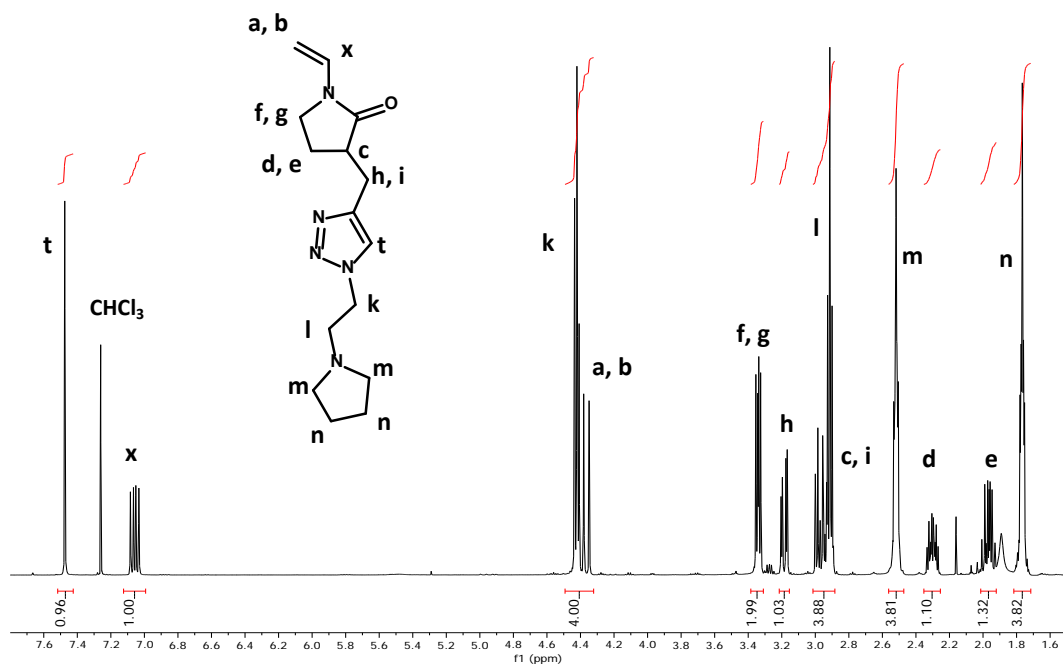
3-(3-((3-oxo-3-(2-fenoxietoxi)propil)amino)propil)-1-vinil-2-pirrolidona (VP-2PE)



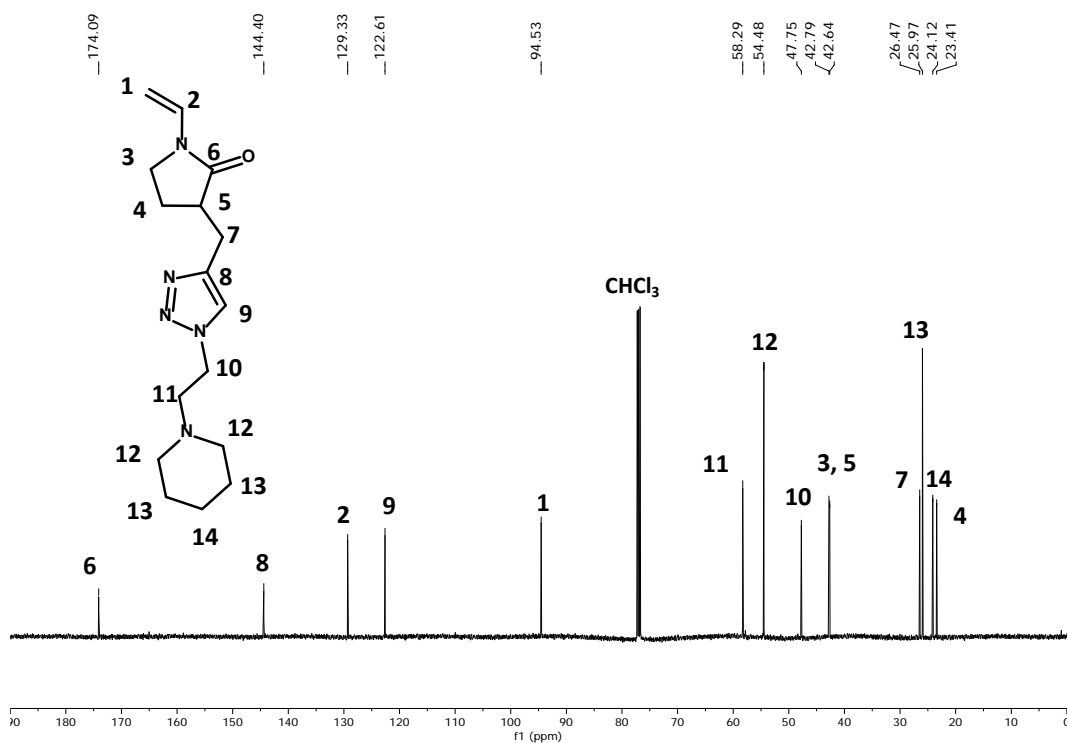
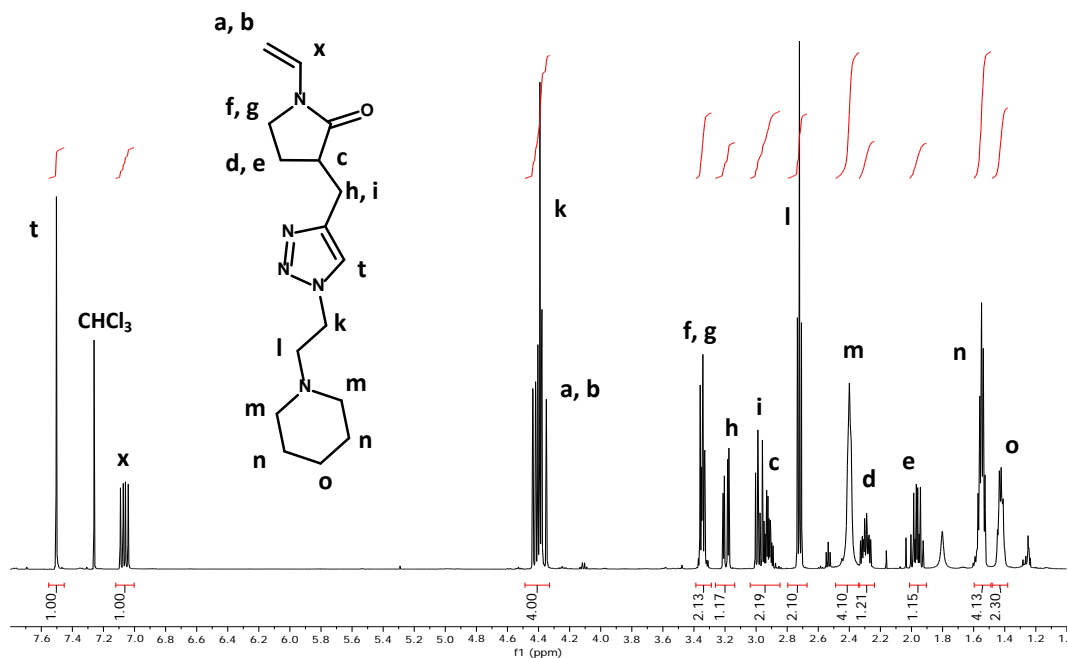
Bromuro de N,N,N-trietil-3-(2-oxo-1-vinilpirrolidon-3-il) propan-1-amonio (VPN+)



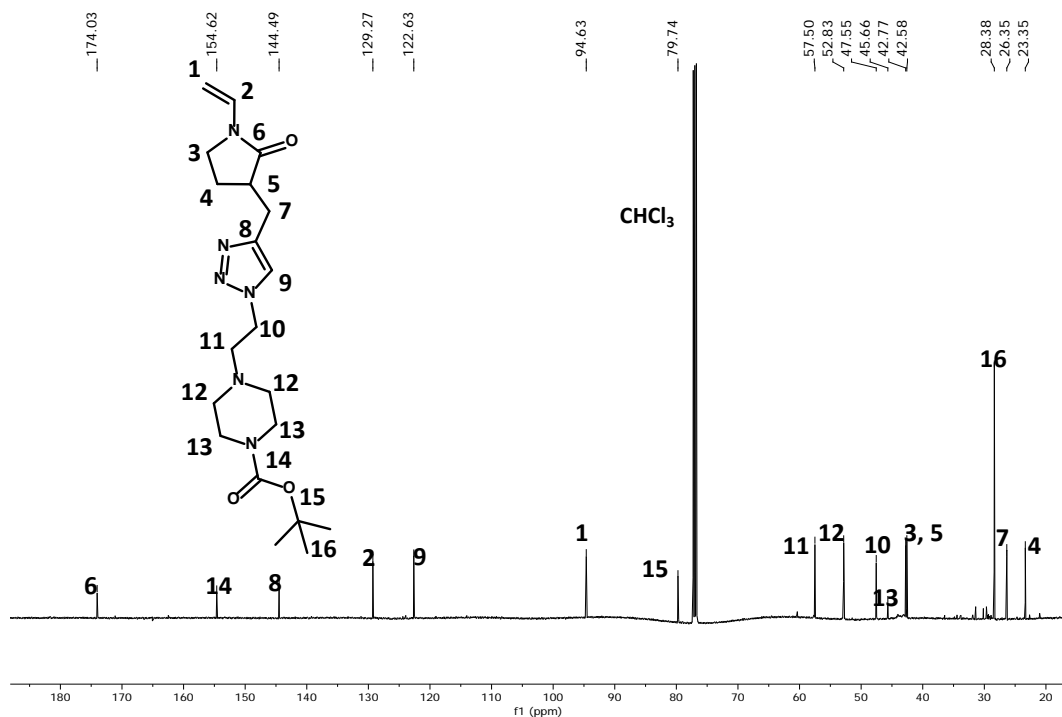
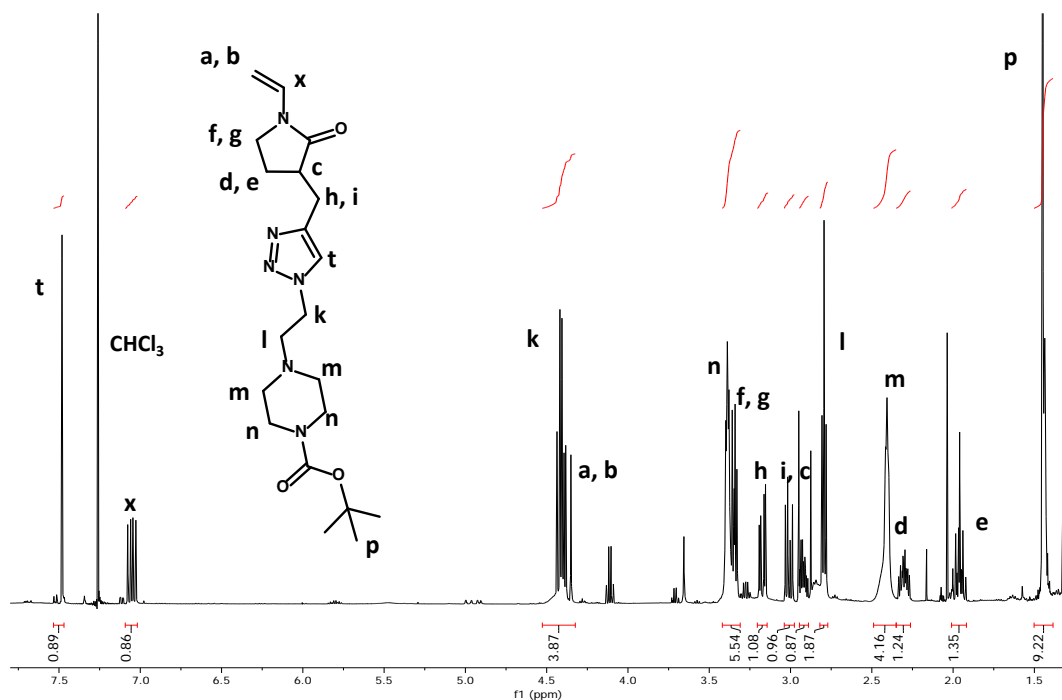
3-((1-(2-(pirrolidin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1-vinil-2-pirrolidona (VPcpl)



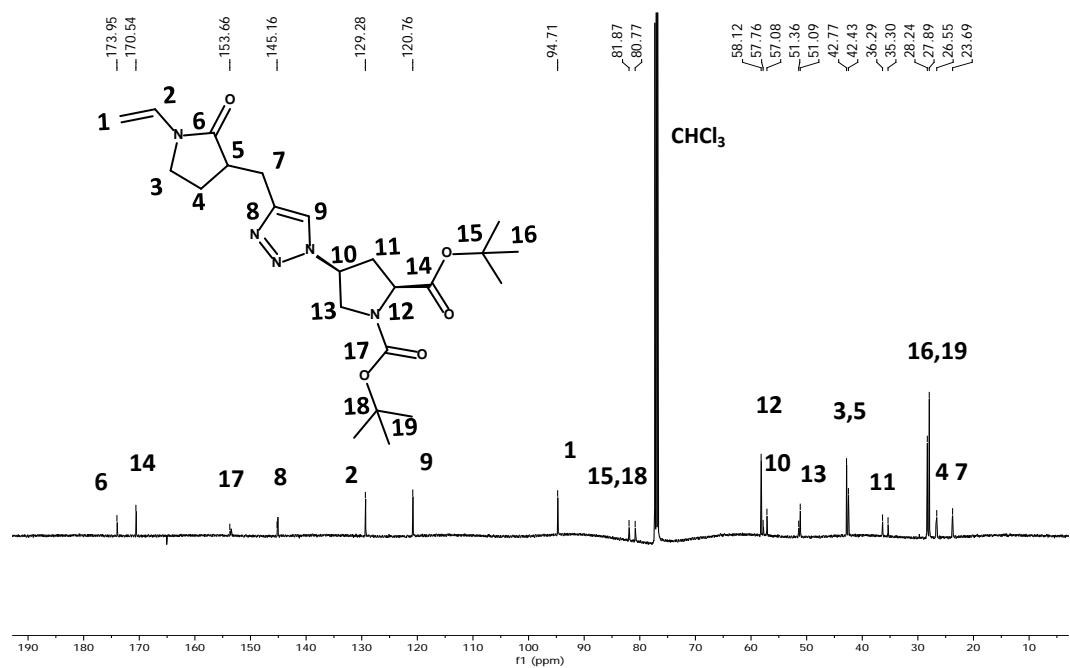
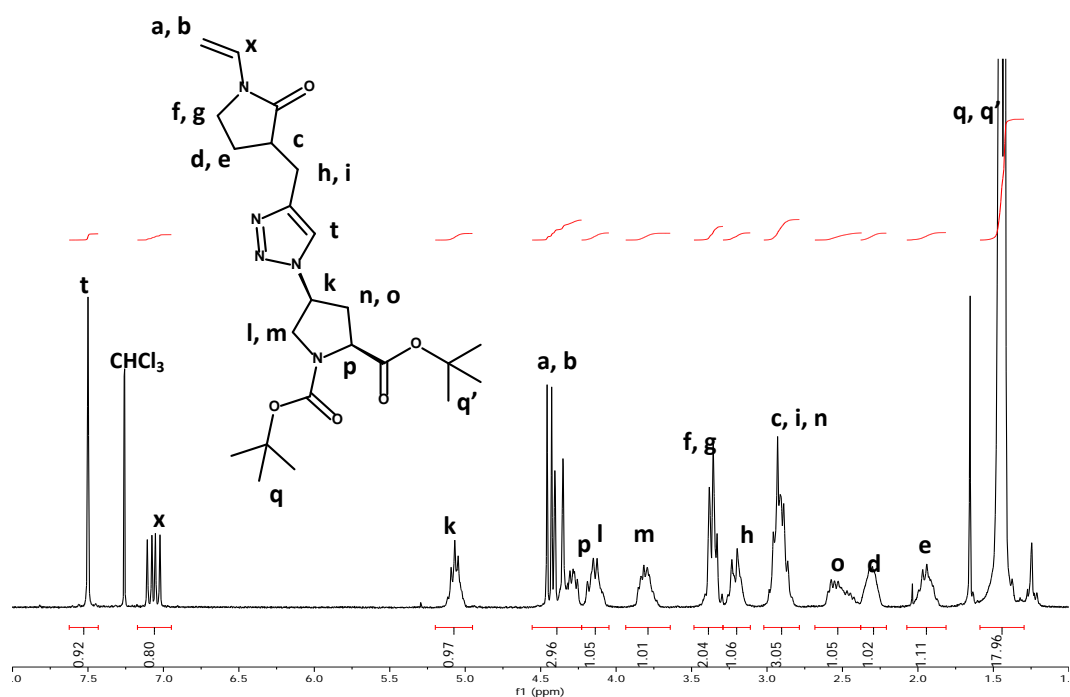
3-((1-(2-(piperidin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1-vinil-2-pirrolidona (VPcpp)



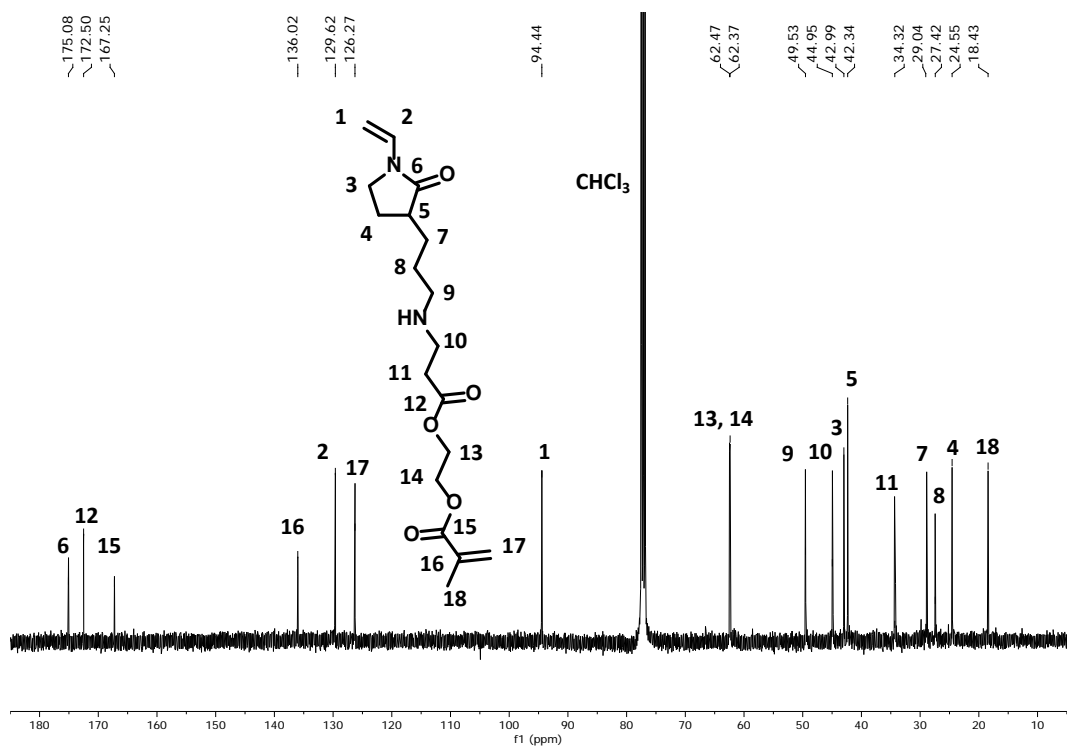
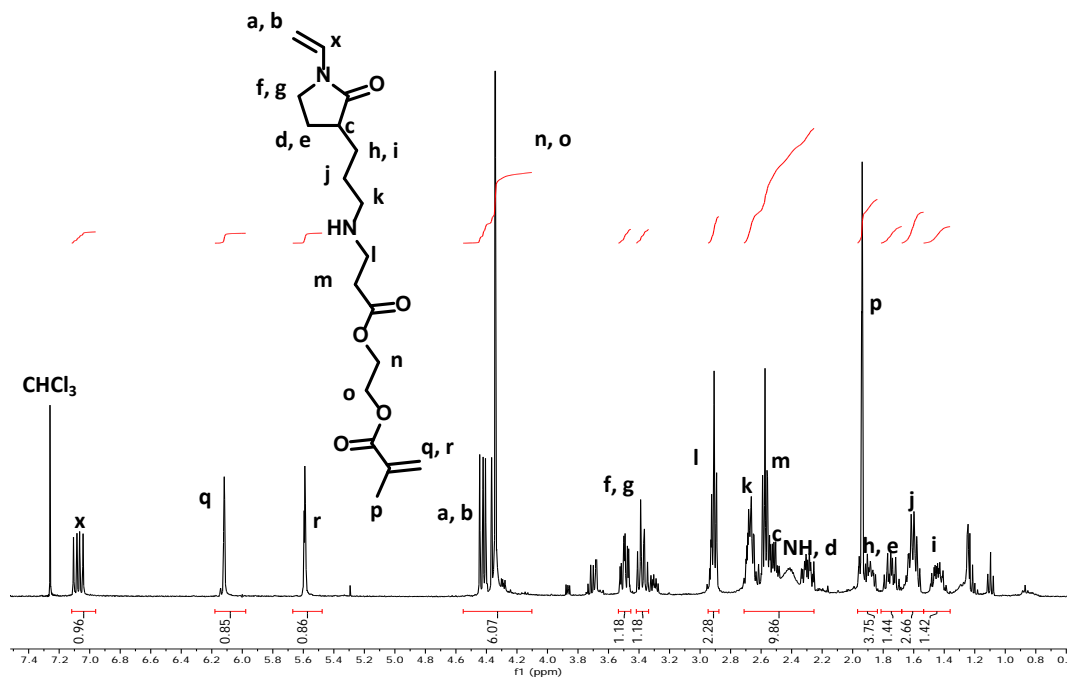
Terc-butil 4-(2-(4-((1-vinil-2-pirrolidon-3-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil) piperazin-1-carboxilato (VPcpz-Boc)



Di-terc-butil (2S,4S)-4-(4-((2-oxo-1-vinilpirrolidin-3-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)pirrolidin-1,2-dicarboxilato (VPcrol-Boc₂)



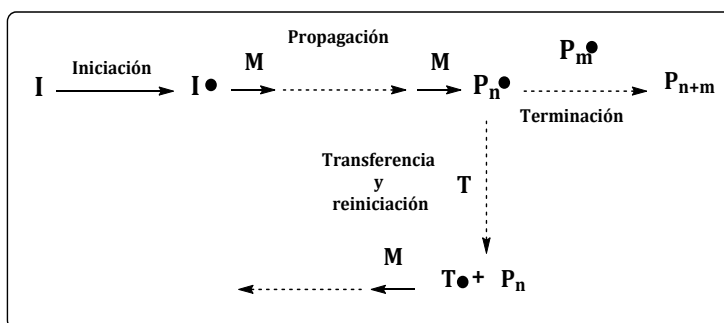
3-((3-oxo-3-(2-metacrililoixietoxi)propil)amino)propil)1-vinil-2-pirrolidona (MVhid)



Anexo 2

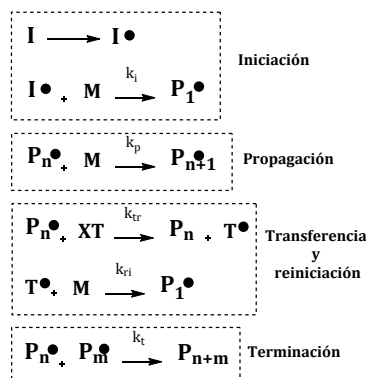
Sección 1.1. Polimerización radical convencional

La polimerización radical convencional se puede describir de acuerdo al esquema básico del Esquema A2.1. Los radicales son especies orgánicas muy inestables por contener un electrón desapareado en su estructura y, por lo tanto, con una elevada reactividad. Estas especies reactivas se generan por una ruptura homolítica de un enlace covalente mediante un aporte energético (generalmente por vía térmica, fotoquímica o por reacciones de oxidación-reducción), comenzando así el proceso de polimerización (etapa de iniciación). Debido a su alta inestabilidad, los radicales reaccionan con especies ricas en electrones (en este caso con los dobles enlaces vinílicos de los monómeros), originando una reacción en cadena en la que se pueden adicionar desde varias decenas hasta millares de moléculas de monómero (etapa de propagación). En este trabajo, los radicales generados en el medio de reacción mediante una iniciación térmica atacan al enlace N-vinilo regioselectivamente, siendo el carbono del doble enlace no sustituido más accesible que el carbono vecinal al nitrógeno, generando un nuevo radical en el carbono secundario, pasando a ser el extremo creciente de cadena. Esta reacción en cadena es la etapa determinante de la polimerización, y tiene lugar hasta que el macrorradical se desactiva (etapa de terminación). La desactivación puede ocurrir de dos maneras principalmente: 1- si el centro activo en crecimiento P_n^\bullet reacciona con otro centro activo en crecimiento P_m^\bullet , se formará una especie o cadena “muerta” P_{n+m} que formará parte del material final, o 2- el centro activo en crecimiento P_n^\bullet reacciona con un compuesto T presente en el medio de reacción, capaz de reiniciar un nuevo proceso de reacción en cadena, dando una especie “muerta” (P_n) y a un nuevo centro activo (T^\bullet). Este proceso de reiniciación, conocido como transferencia, es muy común en polimerización radical convencional, donde T puede ser moléculas de disolvente o el propio monómero, incluso las propias cadenas de polímero.



Esquema A2.1: Esquema del proceso de polimerización radical, donde I iniciador, I^\bullet =centro activo primario, M=monómero, P_n^\bullet =centro activo en crecimiento, P_{n+m} , P_n =cadenas “muerta” de polímero, T=agente de transferencia, T^\bullet =centro activo en crecimiento tras la transferencia.

Basándonos en los diferentes procesos de la polimerización radical convencional descritos en el Esquema A2.1, las expresiones cinéticas se podrían expresar de la manera siguiente:



donde I^\bullet y P_n^\bullet son los radicales primarios y los radicales en crecimiento respectivamente, y k_i , k_p , k_{tr} , k_{ri} y k_t son las constantes cinéticas de los diferentes procesos de iniciación, propagación, transferencia, reiniciación y terminación, respectivamente.

La velocidad de cada proceso viene dada por las expresiones cinéticas características, siendo directamente proporcional a la constante cinética del proceso y a la concentración de cada reactivo. Así, las velocidades de propagación y de transferencia vienen dadas por las ecuaciones 1 y 2, respectivamente:

$$R_p = k_p [P_n^\bullet] [M] \quad (\text{ec. 1})$$

$$R_{tr} = k_{tr} [P_n^\bullet] [T] \quad (\text{ec. 2})$$

El crecimiento de la cadena depende del balance de aquellos procesos que la hacen crecer (propagación) y aquellos que la desactivan (terminación y/o transferencia). Suponiendo que hay solo un tipo de transferencia el grado de polimerización vendría dado por:

$$\overline{DP}_n = \frac{R_p}{R_t + R_{tr}} \quad (\text{ec. 3})$$

donde \overline{DP}_n es el grado de polimerización, es decir, el número promedio de unidades por cadena y R_p , R_t y R_{tr} son las velocidades de los procesos de propagación, terminación y transferencia, respectivamente (en moles por unidad de tiempo).

De esta expresión se llega fácilmente a la ecuación de Mayo:

$$\frac{1}{\overline{DP}_n} = \frac{R_t}{R_p} + \frac{R_{tr}}{R_p} = \frac{1}{\overline{DP}_{n0}} + \frac{k_{tr}}{k_p} \frac{[T]}{[M]} = \frac{1}{\overline{DP}_{n0}} + C_T \frac{[T]}{[M]} \quad (\text{ec. 4})$$

donde \overline{DP}_{n0} es el peso molecular de referencia de una reacción sin transferencia (desactivación solo por terminación) y C_T (la relación de k_{tr} y k_p) es la constante de transferencia.

De manera general, esta ecuación varía con la conversión en una reacción en un reactor discontinuo y las cadenas no son uniformes en tamaño, es decir, la polimerización radical

convencional da lugar típicamente a mezclas de cadenas polidispersas (índice de dispersidad en torno a 2 o superior). Se puede definir el “acumulado” de polímero como el material que recoge las cadenas formadas a diferentes tiempos y que en este caso presenta una distribución de tamaños típicamente ancha.

En el caso particular de transferencia al monómero la expresión cambia de la siguiente manera:

$$\frac{1}{DP_n} = \frac{1}{DP_{n0}} + C_T \text{ (ec. 5)}$$

En este caso concreto, si la desactivación está dominada por la transferencia al monómero, el peso molecular disminuye significativamente y la polidispersidad puede ser inferior a la típica.

Si en lugar de tener un único tipo de monómero tuviésemos dos, tendríamos polimerización simultánea de los dos componentes, cuya distribución a lo largo de la cadena macromolecular sería estadística (Figura A2.1).¹ Esta distribución está relacionada directamente con el modelo de propagación, basado en el modo de incorporación de las diferentes especies a las cadenas.

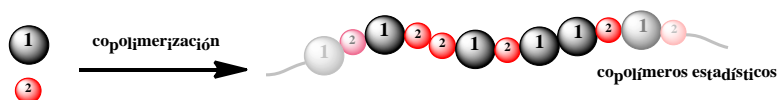


Figura A2.1: Esquema del proceso de copolimerización de monómeros 1 y 2, y la formación de una cadena de copolímero estadístico.

A lo largo de los años se ha utilizado el modelo terminal² para explicar la reactividad del macrorradical en crecimiento con las especies de la reacción, que considera que sólo depende de la naturaleza de la unidad terminal del macrorradical (Figura A2.2). Sin embargo, desde los experimentos de Fukuda en 1985,³ se ha aceptado que el modelo físicamente válido para explicar la totalidad de la reacción es el modelo “penúltimo”, el cual considera que la reactividad del macrorradical creciente depende no sólo de la unidad terminal sino también de la penúltima. Sin embargo, por la alta complejidad de este modelo se sigue utilizando el modelo terminal que proporciona información sobre la composición y microestructura de los copolímeros obtenidos.⁴

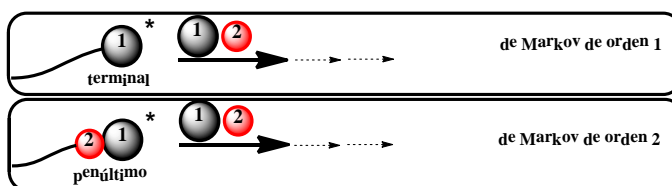


Figura A2.2: Esquema de la etapa de propagación de dos tipos de radicales dependiendo del modelo terminal y penúltimo.

El modelo terminal considera que si para una copolimerización de dos componentes 1 y 2, encontramos un macrorradical en crecimiento con una unidad terminal 1, si éste tiene una mayor

reactividad hacia 1 que hacia 2, significa que tendremos una mayor probabilidad de encontrar la secuencia 11 que la 12 en la cadena polimérica. Por lo tanto, este modelo de propagación da lugar a una distribución de unidades monoméricas que siguen una estadística de Markov de orden 1, lo que significa que la probabilidad de encontrar una unidad en una posición concreta de la cadena depende de la naturaleza de la unidad vecina. Por el contrario, el modelo penúltimo seguirá una estadística de Markov de orden 2, donde la probabilidad de encontrar una unidad depende de la naturaleza de las dos unidades vecinas inmediatamente anteriores a ella.

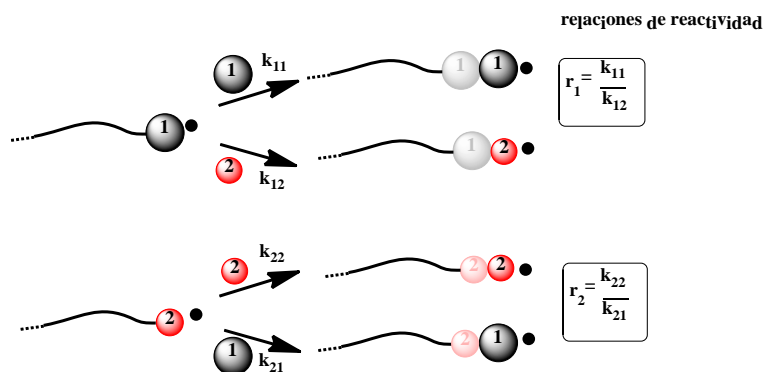


Figura A2.3: Posibles reacciones de propagación en una copolimerización binaria y las relaciones de reactividad según el modelo terminal.

Basándose en este modelo terminal, se comenzó a estudiar la cinética de las posibles reacciones de propagación de la polimerización radical binaria. Científicos de la época, destacando Mayo y Lewis⁵ entre otros,⁶ llevaron a cabo un desarrollo cinético básico de este modelo terminal de acuerdo con la Figura A2.3. Definían dos macrorradicales crecientes en una copolimerización de dos componentes (1 y 2), donde cada uno de ellos podría reaccionar con el monómero idéntico a la unidad terminal (Markov orden 1) o con el otro monómero (Markov orden 2), apareciendo cuatro constantes distintas de reacción. Teniendo en cuenta que cada macrorradical tiene dos constantes de reacción diferentes, se define el concepto de “relación de reactividad” (r) como la relación de reactividades hacia el monómero idéntico (homopropagación) y hacia el monómero distinto (propagación cruzada), expresada como una relación de constantes. Este parámetro define la mayor o menor reactividad de una cadena creciente hacia uno u otro monómero. Para un macrorradical terminado en el monómero 1 (r_1) será el cociente entre la constante de velocidad de homopropagación (k_{11}) entre la constante de velocidad de propagación cruzada (k_{12}).

Como se dijo anteriormente, las constantes cinéticas de reacción dependen de la concentración de los monómeros implicados en la polimerización. Así, se llegó a la ecuación de composición del modelo terminal, llamada “ecuación de Mayo-Lewis”:

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{[M_1](r_1[M_1] + [M_2])}{[M_2]([M_1] + r_2[M_2])} \quad (\text{ec. 6})$$

donde $[M_1]$ y $[M_2]$ son las concentraciones molares de los monómeros implicados.

Ésta es una ecuación diferencial que sólo da información de un determinado instante de la reacción. Se puede escribir en forma de fracciones molares:

$$f_1 = \frac{r_1 F_1^2 + F_1(1 - F_1)}{r_1 F_1^2 + 2F_1(1 - F_1) + r_2(1 - F_1)^2} \quad (\text{ec. 7})$$

donde f_i =fracción molar instantánea de i en el copolímero siendo $i=1, 2$ ($f_1+f_2=1$), F_i = fracción molar instantánea de i en la alimentación ($F_1+F_2=1$) y r_1 y r_2 = relaciones de reactividad de los monómeros 1 y 2 respectivamente.

Para un determinado medio de reacción con una mezcla de monómeros dada (F_1), la ecuación describe (conocidos r_1 y r_2), cómo es el copolímero que se forma en ese instante a nivel composicional (f_1). La ecuación diferencial 6 se puede integrar obteniéndose una ecuación que ya es capaz de dar información de la evolución de la reacción en función del tiempo o de la conversión:

$$\frac{[M_2]}{[M_2]_0} = \left(\frac{[M_2]_0 [M_1]}{[M_1]_0 [M_2]} \right)^{\frac{r_2}{1-r_2}} \left(\frac{(r_1 - 1) \left(\frac{[M_1]}{[M_2]} \right) - r_2 + 1}{(r_1 - 1) \left(\frac{[M_1]_0}{[M_2]_0} \right) - r_2 + 1} \right)^{\frac{r_1 r_2 - 1}{(1-r_1)(1-r_2)}} \quad (\text{ec. 8})$$

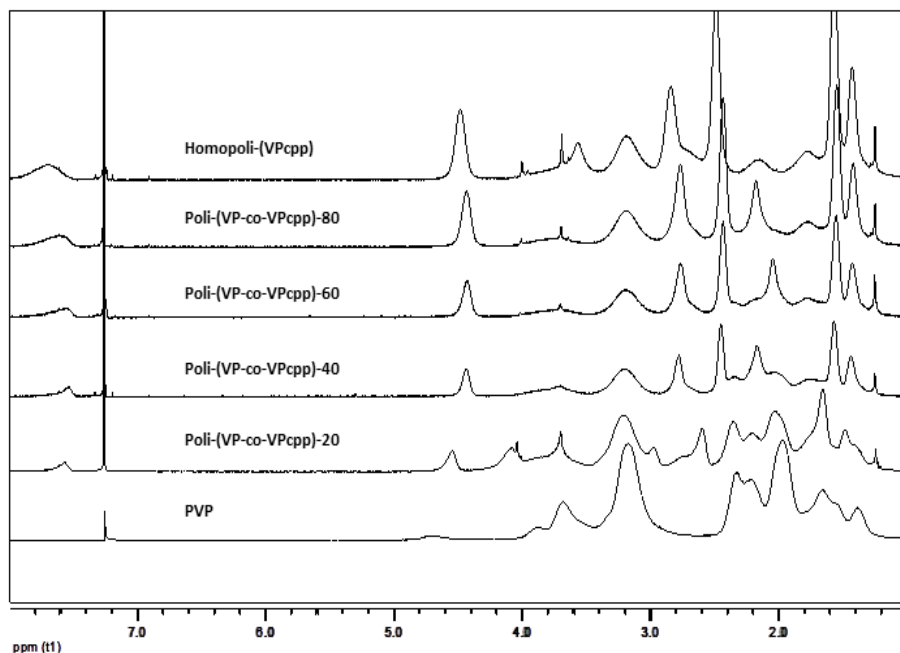
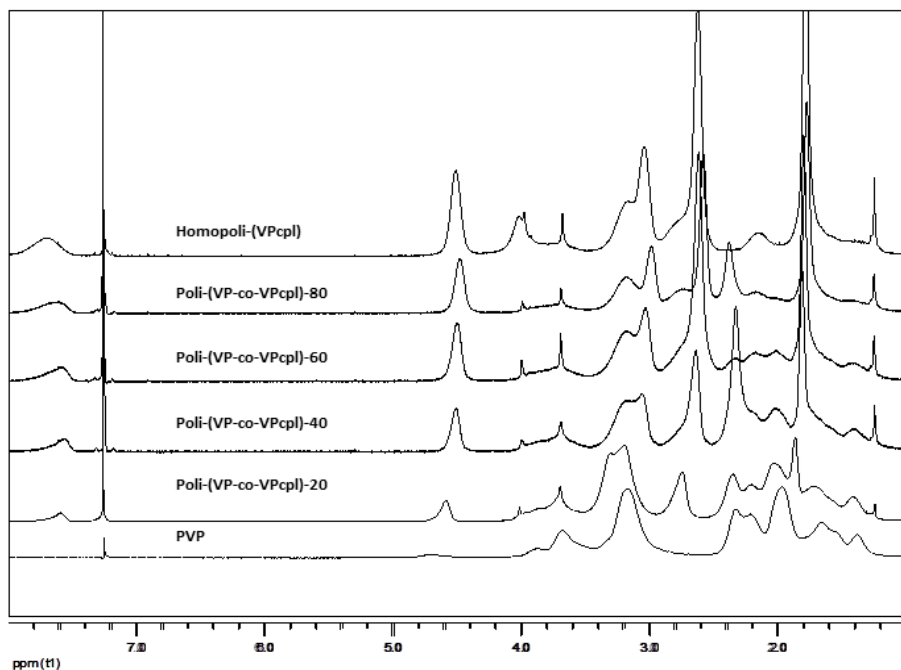
donde $[M_i]_0$ es la concentración del monómero i (siendo $i=1,2$) a tiempo 0. Esta ecuación describe la composición de la macromolécula en función del tiempo, dando datos composicionales promedio del acumulado del polímero (o sea, del conjunto de las cadenas formadas hasta una conversión dada).

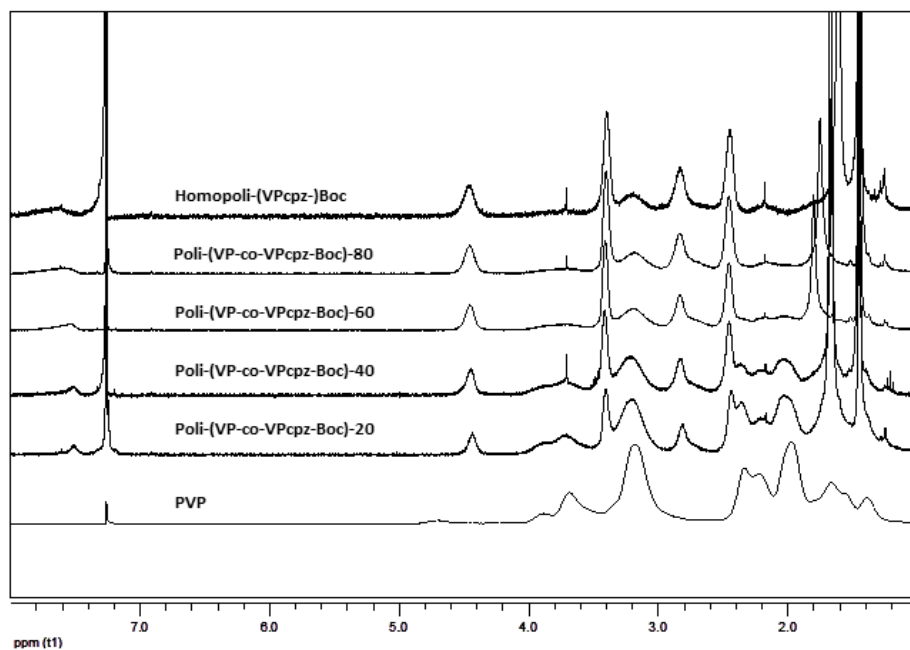
Bibliografía

1. M. POLÍMEROS Javier Areizaga, *Elorza, Juan J. Irui Síntesis*, 2002.
2. G. Odian, *Principles of Polymerization, Fourth Edition*, 2004, 464-543.
3. T. Fukuda, Y. D. Ma and H. Inagaki, *Macromolecules*, 1985, **18**, 17-26.
4. K. Matyjaszewski and T. P. Davis, *Handbook of radical polymerization*, Wiley Online Library, 2002.
5. F. R. Mayo and F. M. Lewis, *Journal of the American Chemical Society*, 1944, **66**, 1594-1601.
6. T. Alfrey Jr and G. Goldfinger, *The Journal of Chemical Physics*, 1944, **12**, 205-209.

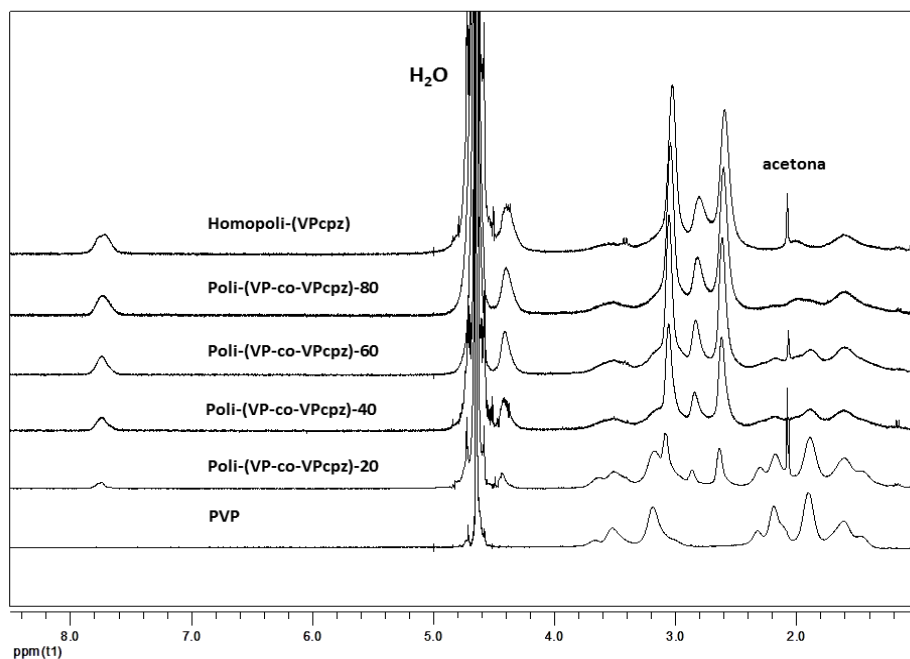
Anexo 3

Sección 3.1. Espectros de ^1H RMN de los copolímeros y homopolímeros sintetizados a partir de VP y VPcpx realizados en CDCl_3 .

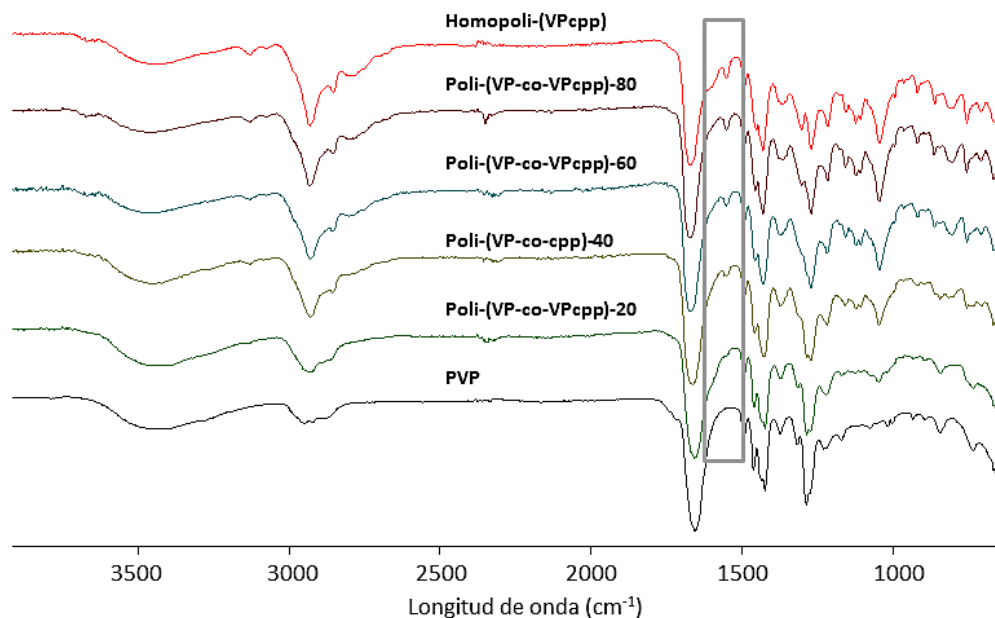
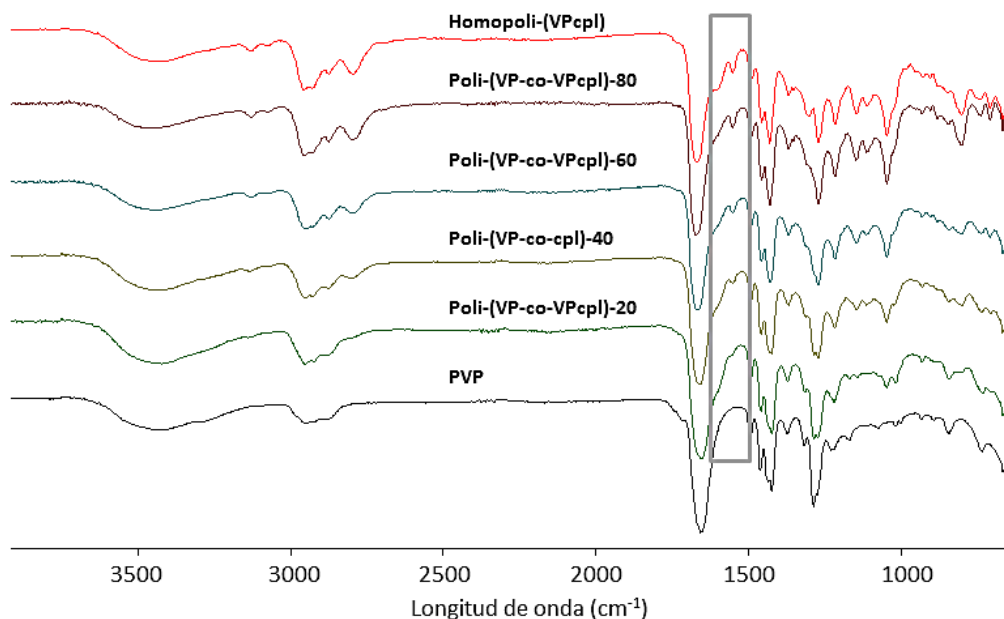


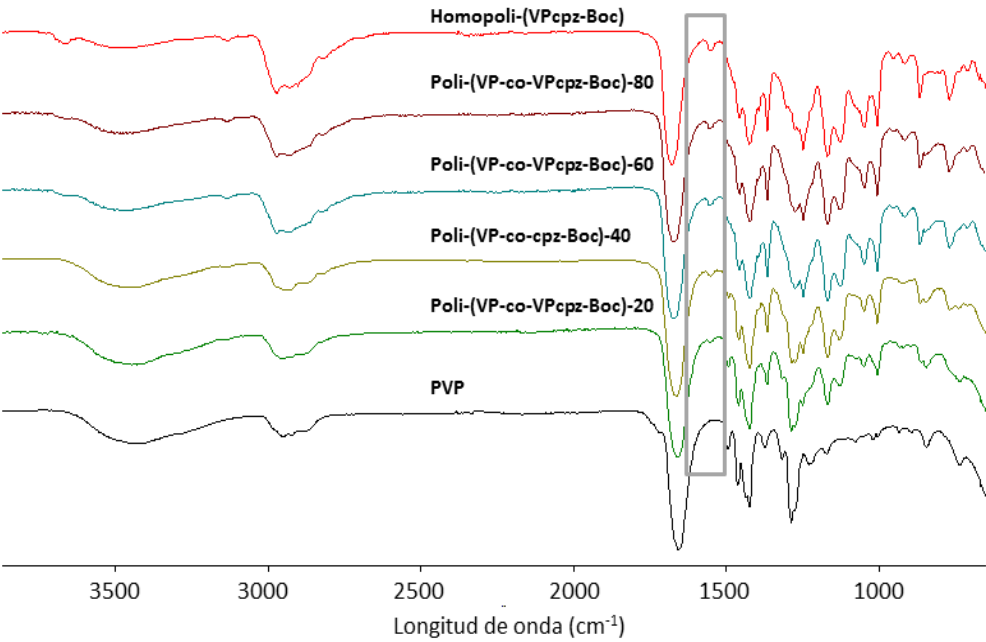


Sección 3.2. Espectros de ^1H RMN de los copolímeros y homopolímero sintetizados portadores de piperazina desprotegida realizados en D_2O .

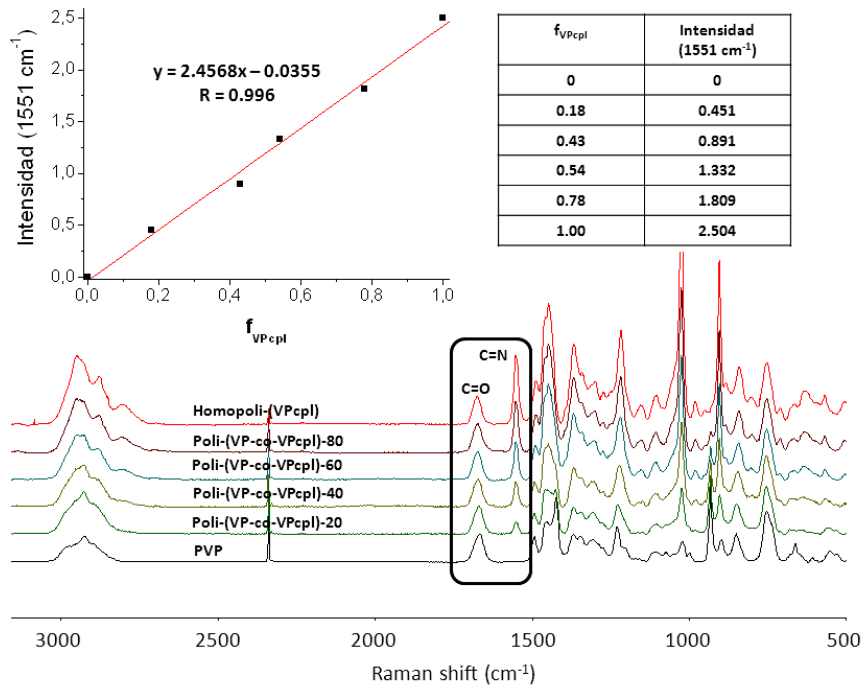


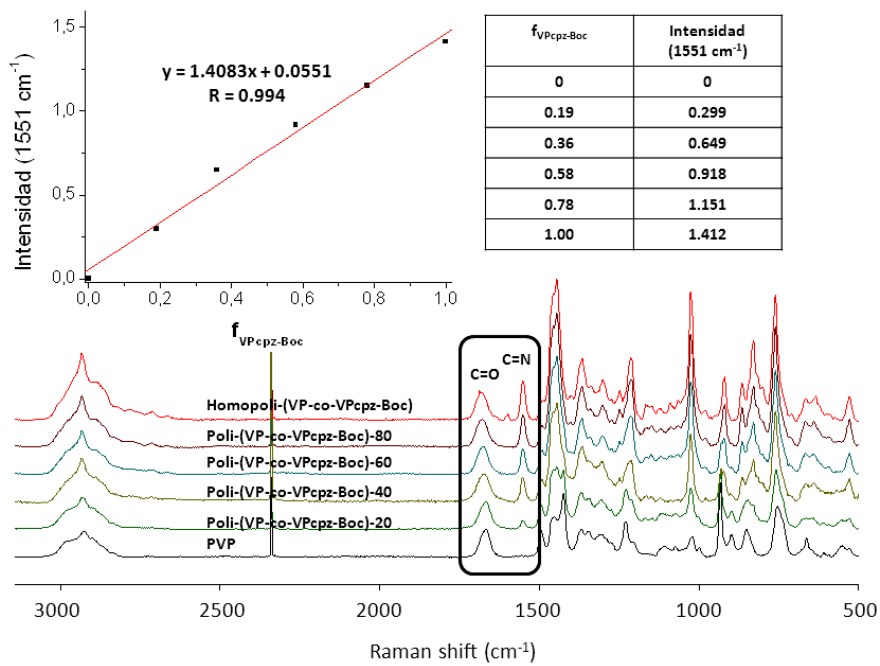
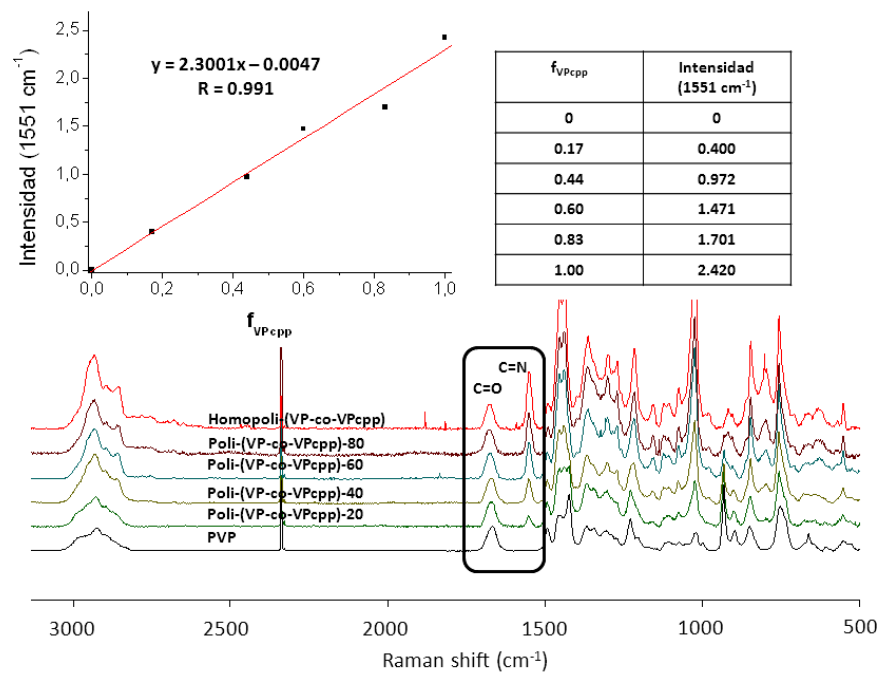
Sección 3.3. Espectros de IR de los copolímeros y homopolímeros sintetizados a partir de VP y VPcpx, indicando la banda correspondiente al enlace C=N correspondiente al grupo triazol (normalizando a 1 la intensidad de la banda del C=O).





Sección 3.4. Espectros de Raman de los copolímeros y homopolímeros sintetizados a partir de VP y VPcp, indicando la banda correspondiente al enlace C=N correspondiente al grupo triazol, así como la variación de su intensidad normalizando a 1 la intensidad de la banda del C=O a 1670.5 cm⁻¹.

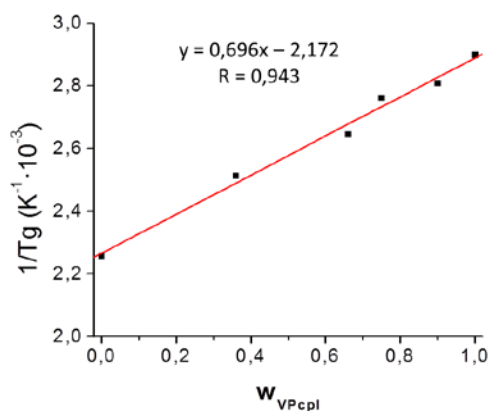




Sección 3.5. Representación gráfica de la inversa de la Tg experimental para los polímeros obtenidos de VP y VPcpx a diferentes fracciones en peso de VPcpx.

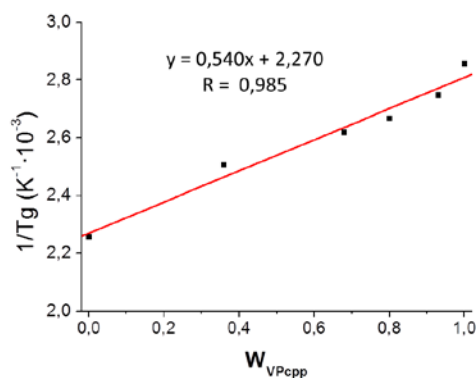
- Copolímeros de poli-(VP-co-VPcpl) y homopoli-(VPcpl).

F_{VPcpl}	W_{VPcpl}	Tg (DSC)	Tg (Fox)	Tg (DSC)-Tg(Fox)
0.20	0.36	398	402	3.9
0.40	0.66	378	373	4.9
0.60	0.75	362	365	3.2
0.80	0.90	356	353	3.9
1.00	1.00	345	345	0



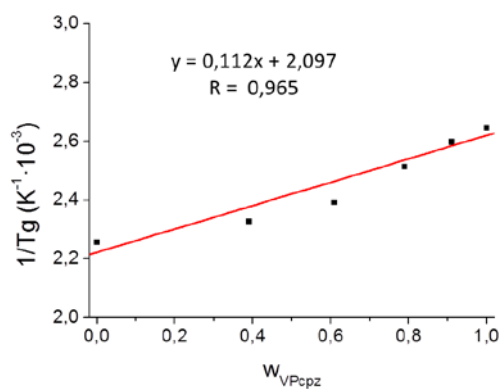
- Copolímeros de poli-(VP-co-VPcpp) y homopoli-(VPcpp).

F_{VPcpp}	W_{VPcpp}	Tg (DSC)	Tg (Fox)	Tg (DSC)-Tg(Fox)
0.20	0.36	399	399	5.3
0.40	0.68	382	382	6.8
0.60	0.80	375	375	9.7
0.80	0.93	364	364	8.8
1.00	1.00	350	350	0



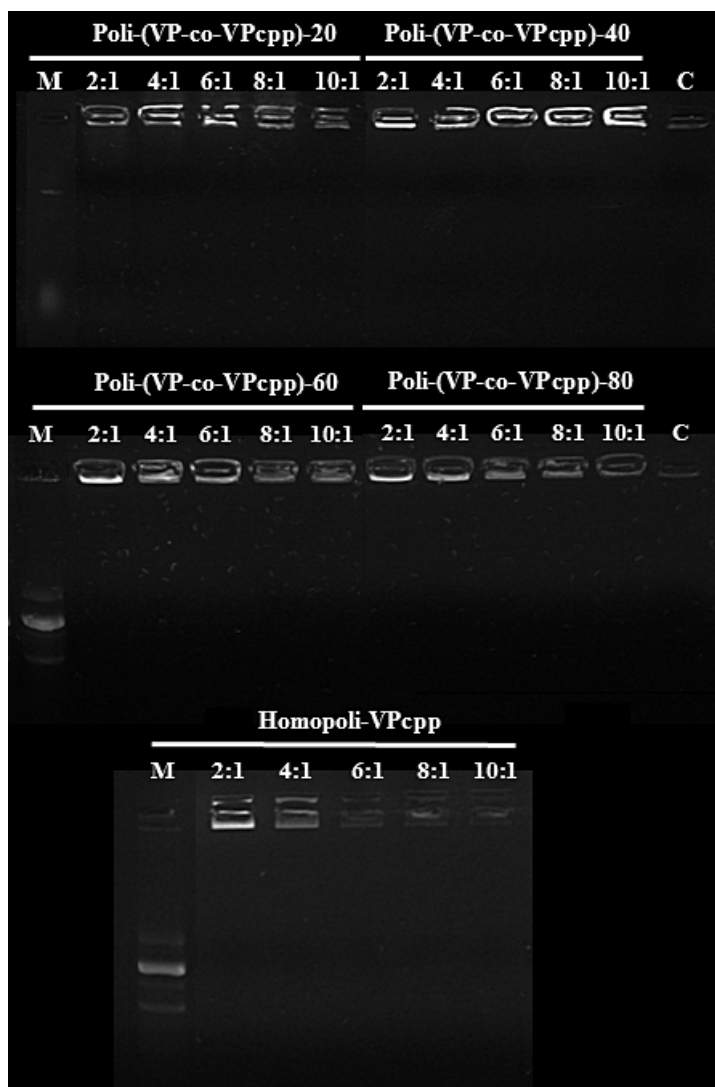
- Copolímeros de poli-(VP-co-VPcpz) y homopoli-(VPcpz).

F_{VPcpz}	W_{VPcpz}	Tg (DSC)	Tg (Fox)	Tg (DSC)-Tg(Fox)
0.20	0.39	430	415	14.8
0.40	0.61	418	401	17.1
0.60	0.79	398	386	11.5
0.80	0.91	385	381	3.5
1.00	1.00	378	378	0

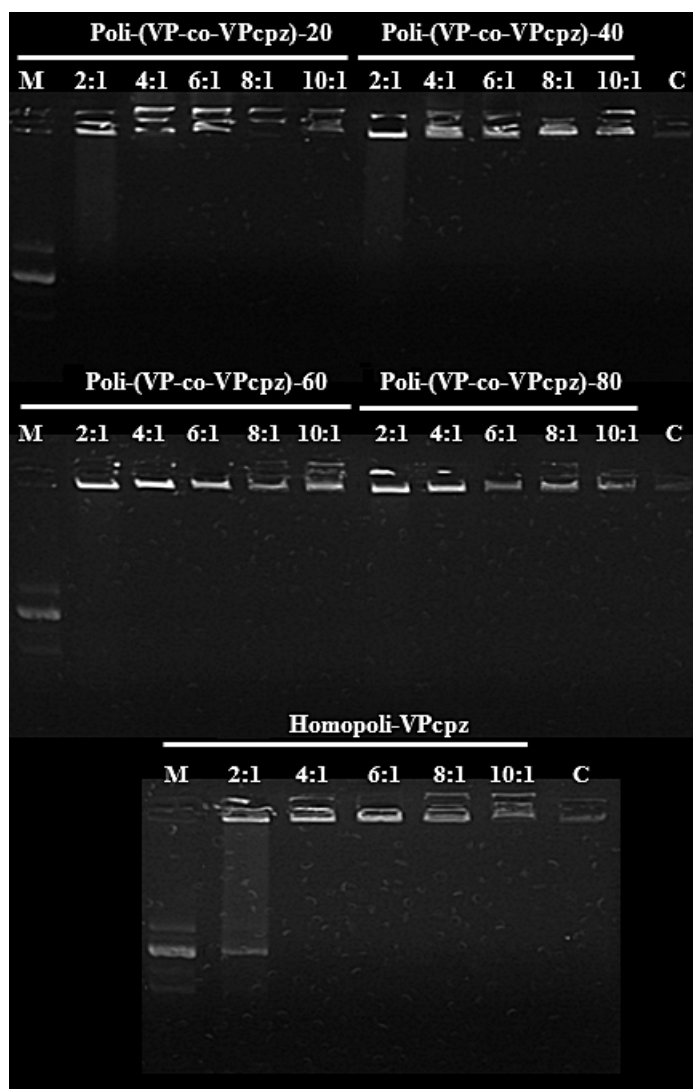


Anexo 4

Sección 4.1. Movilidad electroforética del ADN plasmídico en los complejos polímero/ADN de a diferentes relaciones N/P, utilizando los polímeros poli-(VP-co-VPcpp). M = ADN libre. C = complejos PEI/ADN a N/P 8:1.

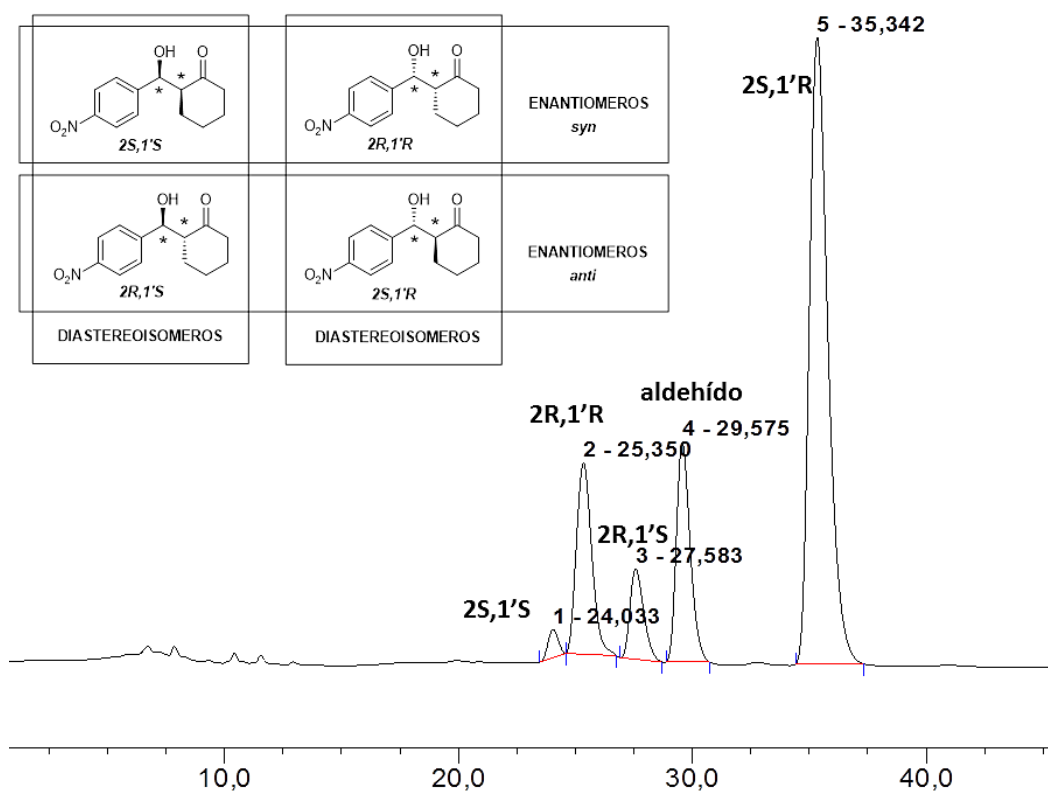


Sección 4.2. Movilidad electroforética del ADN plasmídico en los complejos polímero/ADN de a diferentes relaciones N/P, utilizando los polímeros poli-(VP-co-VPcpz). M = ADN libre. C = complejos PEI/ADN a N/P 8:1.



Anexo 5

Sección 5.1. Ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC del análisis de la reacción aldólica entre el p-nitrobenzaldehído y la ciclohexanona donde aparecen los posibles productos de la reacción.



RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

El anclaje de polímeros a especies activas para actuar como transportadores o moduladores de propiedades de estas especies es un protocolo de gran interés biomédico y tecnológico en áreas como el tratamiento del cáncer, superficies, catálisis o terapia génica. Un polímero muy atractivo para esta aplicación es la poli-(N-vinilpirrolidona) (PVP), un polímero anfifílico y no iónico, actualmente muy utilizado en numerosas aplicaciones debido a su estabilidad química, biocompatibilidad, así como su solubilidad tanto en disolventes orgánicos como en agua. Sin embargo, la PVP obtenida en modo convencional no tiene grupos funcionales que permitan la unión covalente a entidades de interés.

El poli-etilenglicol (PEG) es un polímero similar a la PVP en cuanto a propiedades. Además, presenta grupos funcionales en los extremos de cadena, lo que ha permitido su funcionalización con especies activas y su uso en un amplio rango de aplicaciones dentro de este ámbito. Aun así, el anclaje de una o dos especies activas por cada cadena polimérica puede resultar insuficiente para determinadas aplicaciones.

Diferentes grupos de investigación han llevado a cabo diseños “*bottom-up*” alternativos, con mayor capacidad de modificación que los derivados de PEG, basados en la funcionalización de monómeros precursores. Esto ha permitido por ejemplo preparar conjugados metacrílicos de cadena lateral con antitumorales, ya en fase clínica avanzada. En esta tecnología “*bottom-up*” destacan de manera importante dos características o posibilidades: 1- conseguir multifuncionalidad es extremadamente sencillo y flexible, pues simplemente hay que elegir los monómeros adecuados en la proporción deseada, y 2- aunque los esfuerzos sintéticos se centran en los monómeros precursores, es posible llevar a cabo polimerizaciones convencionales en condiciones suaves, sencillas, y en muchos casos en agua.

La mencionada estrategia “*bottom-up*” se ha aplicado a la funcionalización de PVP con diferentes grupos, aunque no a aminas a pesar de tener propiedades muy interesantes. Estos derivados del amoniaco son grupos funcionales de gran interés por su alta polaridad y su capacidad de ionizarse dependiendo del medio en el que se encuentren. También su nucleofilia resulta muy atractiva, así como la tendencia a establecer interacciones no covalentes con especies electrofílicas simulando por ejemplo los centros activos de enzimas que se encuentran en la naturaleza. Por ello, la finalidad de esta tesis es la obtención por primera vez de polímeros de PVP con una funcionalidad lateral de grupos amina de diferente naturaleza para así ampliar la aplicabilidad de este polímero con excelentes propiedades en los campos biomédico y tecnológico.

El primer objetivo de esta tesis fue el diseño, la síntesis y la caracterización de monómeros derivados de la N-vinil-2-pirrolidona (VP) con diferentes aminas alifáticas primarias, secundarias, terciarias o cuaternarias, así como el estudio de su polimerizabilidad con el monómero nativo de VP para la obtención de esqueletos de PVP portadores de aminas (con control de carga de las mismas) mediante la técnica “*bottom-up*” antes mencionada. En primer lugar se obtuvieron dos derivados monoalquilados de la VP portadores de los grupos bromuro (VPBr) y acetileno terminal (VPgyl). El

primero de ellos se utilizó para la obtención de los monómeros aminados con los grupos amina primaria, tanto en su forma libre (VPNH₂) como su forma protegida por el grupo ftalimida (VPPhta), y amina cuaternaria (VPN+). A partir de VPgyl se obtuvieron diferentes monómeros de VP funcionalizados con aminas mediante química “click” catalizada por cobre (I), consiguiendo VP con aminas secundarias como la L-prolina (VPcprol) y terciarias como la pirrolidina (VPcpl), la piperidina (VPcpp) y la piperazina protegida (VPcpz-prot, de cuya desprotección resulta un ciclo con una amina terciaria y otra secundaria). Los polímeros derivados de estos monómeros se obtuvieron mediante una polimerización radical convencional en disolución usando 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador térmico. Además, se llevó a cabo un estudio de la reactividad en copolimerización con la VP nativa usando como modelo el monómero VPPhta, estudio que mostró que los copolímeros tienen una distribución de monómeros prácticamente al azar.

El segundo objetivo de esta tesis doctoral se centró en la evaluación de los polímeros de PVP aminados como posibles vectores no virales en terapia génica, determinando su capacidad de complejar ADN, así como su citotoxicidad y eficiencia de transfección *in vitro*. Para ello, los polímeros de PVP-NH₂ fueron probados en células de tipo fibroblastos 3T3 de ratón, obteniendo excelentes resultados para los polímeros funcionalizados con una carga de 40-60% de amina, siendo el balance transfección/biocompatibilidad muy superior al del polímero comercial poli-L-lisina, también portador de grupos NH₂. Los polímeros de PVP modificados con pirrolidina, piperidina y piperazina fueron evaluados también en células de tipo fibroblastos 3T3 de ratón, obteniendo unos resultados de transfección comparables a la poli-etilenimina hiperramificada (PEI), ampliamente utilizada en ensayos de transfección. Sin embargo, el balance transfección/biocompatibilidad de los polímeros sintetizados en esta tesis fue mucho mejor que los de la PEI. Hay que destacar que en algunos casos (los polímeros aminados con un 40-60% de funcionalidad) la viabilidad celular no bajó del 70%, frente a valores del 35-50% de viabilidad para el caso de PEI con una eficiencia en transfección similar.

Como tercer objetivo se estableció la preparación y evaluación catalítica de diferentes polímeros lineales a partir del monómero VPcprol (portador del grupo L-prolina, ampliamente utilizado como catalizador en síntesis orgánica asimétrica). Para la obtención de polímeros efectivos en catálisis de reacciones aldólicas asimétricas en agua, se hizo uso de la reactividad diferencial de VP y la N-fenilmaleimida (PMI) para obtener sistemas con tendencia a la alternancia en los cuales la activación hidrofóbica de la prolina está maximizada. Se sintetizaron 4 tipos de polímeros diferentes utilizando estos comonómeros: la VPcprol (portador del grupo L-prolina), la PMI (monómero responsable de la activación hidrofóbica) y el poli-etilenglicol metilmetacrilato o PEGMA (macromonómero incluido para el control coloidal de los agregados en el punto isoeléctrico). Se mantuvo la misma relación molar de VPcprol y PMI en todos los polímeros obtenidos, variando únicamente el porcentaje molar de PEGMA para modificar dicha modulación coloidal, con un 2, 5 y 10%. También se sintetizó el copolímero alternante formado por VPcprol y PMI. La reacción aldólica estudiada fue aquella entre la ciclohexanona y el p-nitrobenzaldehído, la cual no funciona en medios acuosos. Del estudio catalítico resultaron rendimientos superiores al 90 % de reacción a pH 4, con una relación anti/syn

óptima de 5:1 y un exceso enantiomérico (ee) superior al 80% del diastereoisómero mayoritario en el caso del copolímero sin PEGMA. Usando los polímeros con PEGMA no se logró una enantioselectividad óptima (relación anti/syn de 2:1 y 25-40% de ee), aunque se consiguió aproximadamente un 95% de rendimiento en 4 horas, frente a un 24% para el polímero sin PEGMA. La reacción llevada a cabo a pH 7 resultó poco enantioselectiva debido a que el punto isoeléctrico (IEP) de los polímeros se encuentra entre pHs de 2.5 y 3, además de que el agua tiene acceso al centro activo, interfiriendo negativamente en la catálisis.

En cuarto lugar se perseguía la obtención de un monómero portador de un fármaco modelo hidroxilado, el 2-fenoxietanol (2PE), a partir de VPNH_2 mediante la reacción de adición de Michael-1,4 con el derivado acrilato del 2PE, obteniéndose el conjugado monomérico VP-2PE. Tras su copolimerización con VP, al contener un β -aminoéster en su estructura, el fármaco es capaz de liberarse en su forma nativa en medio acuoso, de forma pH-dependiente. Además, y también mediante la reacción de Michael-1,4, se preparó un entrecruzante degradable asimétrico (con grupos polimerizables homólogos a la función metacrílica y a la N-vinílica) con la reacción de VPNH_2 con el metacrilato de 2-(acrililoilo) etilo (AOEMA) mediante la reacción de adición selectiva a la función acrílica frente a la función metacrílica del AOEMA.

El quinto objetivo a destacar de este trabajo de tesis se basó en el uso de la reactividad diferencial de VP y metacrilatos para preparar sistemas dispersos con carga positiva localizada mediante la introducción de una pequeña cantidad de VP (o metacrilato) funcionalizada con amina cuaternaria. Se obtuvieron emulsiones alcohólicas a partir de la copolimerización de metacrilato de metilo (MMA) y VP nativa (incluyendo además una pequeña cantidad de monómero aminado); debido al fenómeno de UCST (*Upper Critical Solution Temperature*) del PMMA en alcoholes, las cadenas ricas en MMA se disponen en la fase dispersa abundante en dichas cadenas, y las cadenas ricas en VP en una fase continua pobre en las mismas. La localización de las cargas asociadas a la unidad catiónica se estudiaron mediante la introducción al medio de nanofibras de carbono (CNF) con carga negativa (por tratamiento con ácido). Se demostró que la carga se dispone en la interfase. Al adicionar agua sobre dicha emulsión, se obtienen nanopartículas sólidas (formadas mayormente por cadenas ricas en MMA) con la carga en la superficie debido a que las cadenas de ricas en VP y portadoras de la amina cuaternaria actúan como surfactante.

Como sexto y último objetivo, se utilizó la reactividad diferencial antes mencionada de VP y los metacrilatos para la síntesis mediante fotopolimerización de pseudo co-redes anfifílicas segregadas de cadenas ricas en VP y en metacrilato de butilo (BMA) con dos entrecruzantes asimétricos con grupos polimerizables homólogos a la función metacrílica y N-vinílica, uno degradable en medios acuosos (MVhid) y otro no degradable (MV). Se obtuvieron dos materiales diferentes tras un tratamiento en medio acuoso con pH 8: uno rígido con baja porosidad (entrecruzante MV) y otro material más blando con alta porosidad (entrecruzante MVhid) cuyo tamaño de poro alcanzó el orden de las micras.

ABSTRACT

Anchoring polymers to active species to act as carriers or modulators of the properties of these species is an important issue with interest in biomedical and technological areas, such as cancer treatment, surfaces, catalysis, or gene therapy. A very attractive polymer for this application is poly-(N-vinylpyrrolidone) (PVP), an amphiphilic and non-ionic polymer, which is currently used in numerous technological and biomedical applications owing to its chemical stability, biocompatibility, as well as its solubility in both organic and aqueous solutions. However, PVP obtained in conventional manners does not have functional groups that allow covalent binding of active groups with this purpose.

Polyethylene glycol (PEG) is a polymer with properties similar to those of PVP. Furthermore, as a result of the synthetic process in which PEG is obtained, readily functionalizable groups are present at the two polymer chain ends allowing further functionalization with active species, thus making them attractive for the aforementioned purposes. Nonetheless, anchoring of one or two active species per polymer chain is often insufficient for applications that require multiple functionalities.

Several research groups have carried out a range of "*bottom-up*" designs whereby greater degree of functionalization (compared to that of PEG) is possible owing to the modification of the precursor monomers. This has allowed the preparation of *e.g.* methacrylic monomers conjugated with antitumor-active compounds, the polymers of which are already in advanced clinical trials. With this "*bottom-up*" approach two parameters highlight significantly: 1- achieving multifunctionality is extremely simple and tunable, only requiring selection of the appropriate monomers in the desired feed ratio, and 2- although the synthesis of the new monomer precursors is necessary, it is followed by conventional polymerizations that can be carried out under mild and simple conditions, and, in many cases, in water.

The aforementioned "*bottom-up*" strategy has been applied to the synthesis of PVP with various functional groups, however functionalization with amine groups has not been reported despite their interesting properties. These ammonia derivatives are functional groups with interest because of their high polarity and their ability to ionize depending on the local environment. Additionally, their nucleophilicity is very attractive, as well as the tendency to form non-covalent interactions with electrophilic species, thus simulating the active centers of enzymes found in nature. Therefore, the aim of this thesis is to obtain for the first time PVP polymers with amines as functional side groups in order to extend the applicability of these polymers in biomedical and technological fields.

The first objective of this thesis was the design, synthesis, and characterization of N-vinyl-2-pyrrolidone (VP) derivative monomers functionalized with different aliphatic amines (primary, secondary, tertiary, or quaternary amines), as well as the study of the polymerizability with their native monomer VP to obtain polymers with true PVP backbones carrying amines (with controlled degree of amine functionalization) by the aforementioned "*bottom-up*" technique. Firstly, two mono-alkylated VP derivatives carrying either a bromide group (VPBr), or a terminal acetylene (VPgyl) were obtained. The first was used to obtain monomers with a primary amine, both in its free form

(VPNH₂) as well as its protected form, namely the phthalimide group (VPPhta), and also a quaternary amine (VPN⁺) group. From Vpgyl, different aminated VP monomers were obtained *via* functionalization by “click” chemistry catalyzed by copper(I), yielding VP with secondary amines, such as L-proline (VPcprol), and tertiary amines, such as pyrrolidine (VPcpl), piperidine (VPcpp), and a protected piperazine (VPcpz-prot, whose deprotection yields a cyclic with both secondary and tertiary amine groups). Polymers derived from these monomers were obtained by conventional radical polymerization in solution using 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) as a thermal initiator. Additionally, a study on the copolymerization reactivity of VPPhta with the native VP was carried out, as a model for such functional VPs, finding a random monomer distribution in the obtained copolymers.

The second goal of this thesis is the evaluation of the aminated PVP polymers as potential non-viral vectors in gene therapy, determining their ability to complex DNA, and their cytotoxicity by *in vitro* transfection assays. For this purpose, PVP-NH₂ polymers were tested in 3T3 fibroblast mouse cells with excellent results when polymers used had a degree of functionalization between 40-60%. The transfection/biocompatibility balance was found to be higher than that of a commercial poly-L-lysine polymer, that also carries NH₂ groups. The PVP polymers functionalized with pyrrolidine, piperidine, or piperazine were also evaluated in 3T3 fibroblast mouse cells, obtaining results comparable to a hyperbranched poly(ethyleneimine) (PEI), a polymer widely used in transfection assays. However, the transfection/biocompatibility balance of the polymers synthesized in this thesis was significantly higher than that of PEI. It should be noted that in some cases (*e.g.* for aminated PVP with 40-60% functionality) the cell viability was never lower than 70% which, compared to the PEI viability values of 35-50%, is significantly high, whilst retaining a similar transfection efficiency.

As a third objective, the preparation and the evaluation of the catalytic properties of different linear polymers obtained from VPcprol (carrying L-proline group, widely used as catalyst in asymmetric organic synthesis) were carried out. In order to achieve efficient catalytic properties in aqueous asymmetric aldol reactions, the synthesis of a copolymer comprising of alternating VP and N-phenylmaleimide (PMI) units was synthesized, due of the differential reactivity between VP and PMI yielding an optimal hydrophobic activation of L-proline. VPcprol, PMI (hydrophobic monomer responsible for the activation), and polyethylene glycol methacrylate (PEGMA, a macromonomer included to control colloidal aggregates at the isoelectric point) were used to synthesize four different polymers. The molar ratio of VPcprol to PMI was maintained in all the copolymers, while varying the mole percentage of PEGMA to modify the aforementioned colloidal modulation, using 2, 5, and 10 mol%. The alternating copolymer of VPcprol and PMI was also synthesized. The studied system was the aqueous aldol reaction between cyclohexanone and p-nitrobenzaldehyde, which has been shown to have limited efficiency in aqueous media. From the catalytic assays yields exceeding 90% were obtained at pH 4 with an optimal *anti/syn* ratio of 5:1, and an enantiomeric excess (ee) of over 80% for the major diastereomer (in the case of the copolymer without PEGMA). Using polymers with PEGMA, optimal results were not achieved (*anti/syn* ratio of 2:1, and 25-40% ee were obtained), nonetheless the reaction rates were higher (*ca.* 95% yield in 4 hours, compared to 24% yield for the polymer without PEGMA). The reaction carried out at pH 7 exhibited poor

enantioselectivity because of the isoelectric point (IEP) of the polymers, being between pH 2.5 and 3, besides that water has access to the active center, interfering negatively in the catalysis.

The fourth goal was to obtain a VP monomer bearing a hydroxylated model drug, 2-phenoxyethanol (2PE), using the 1,4-Michael addition reaction between VPNH_2 and an acrylate derivative of 2PE to yield the VP-2PE monomeric conjugate. After the copolymerization with VP the drug can be released in its native form in aqueous media, in a pH-dependent manner, because of the presence of a β -amino ester in the structure. Furthermore, utilizing the 1,4-Michael addition reaction, an asymmetric degradable cross-linker was prepared (homologous polymerizable groups to both methacrylic and N-vinyl functionalities) with VPNH_2 and 2-(acryloyloxy)ethyl methacrylate (AOEMA) by a selective addition reaction to the acrylic function against the methacrylic one.

The fifth highlighted objective of this thesis is based on the use of the differential reactivity of VP and methacrylates for preparing dispersed entities with positive charges, owed to the presence of a small amount of VP (or methacrylate) monomers functionalized with a quaternary amine. Alcoholic emulsions were obtained from the copolymerization of methyl methacrylate (MMA) and VP monomers (also including a small amount of amino monomer). Due to the upper critical solution temperature (UCST) property of PMMA in alcohols, polymer chains rich with MMA were arranged in a dispersed phase, while VP-rich chains were located in a continuous phase. The location of the charges associated with the cationic units was studied by adding carbon nanofibers (CNF) negatively charged by acid treatment. It was shown that the positive moieties were located at the interface. By adding water to the aforementioned emulsion, solid nanoparticles were obtained (composed mainly of MMA chains) with positive charges on the surface, as the chains rich in VP act as surfactants.

The sixth and last aim was the use of the mentioned differential reactivity of VP and methacrylates for the synthesis of pseudo-amphiphilic segregated co-networks composed of VP chains and butyl methacrylate (BMA) chains by photopolymerization, using two asymmetric cross-linkers carrying polymerizable groups homologous to the methacrylic and N-vinyl functions, one degradable in aqueous media (MVhid) and one non-degradable (MV). Two different materials were obtained after treatment with an aqueous medium at pH 8: the latter was a rigid material with low porosity (MV crosslinking) and the former was a soft material with high porosity (MVhid crosslinking), exhibiting a pore size in the micron range.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Habiéndose llevado a cabo las investigaciones descritas en esta tesis doctoral, se han llegado a las siguientes conclusiones:

- 1- Se han descrito por primera vez rutas de síntesis versátiles para la obtención de múltiples monómeros derivados de VP funcionalizados con grupos amina de diferente naturaleza: primaria, secundaria (incluida la L-prolina), terciaria y cuaternaria. Estos monómeros han mostrado ser fácilmente homo- y copolimerizables con VP mediante una simple polimerización radical convencional obteniendo (mediante la aproximación “*bottom-up*”) los polímeros estadísticos funcionalizados de manera controlada con verdadera PVP en la cadena principal.
- 2- El monómero portador del grupo amina primaria ha permitido la puesta a punto de una ruta de anclaje de fármacos hidroxilados mediante una reacción de adición de Michael-1,4, así como la obtención de los conjugados poliméricos PVP-fármaco correspondientes capaces de hidrolizarse en función del pH, liberando controladamente el compuesto activo. Se ha demostrado esta ruta usando el bactericida 2-fenoxietanol como fármaco modelo.
- 3- Polímeros de PVP funcionalizada mediante química “click” con aminas cíclicas (pirrolidina, piperidina y piperazina) han mostrado en medios acuosos una sensibilidad a la temperatura y/o al pH dependiente de la naturaleza de la amina y de la composición. Aquellos polímeros funcionalizados con pirrolidina y piperidina muestran por primera vez en la literatura sistemas de PVP puros con esta doble sensibilidad.
- 4- Los polímeros de PVP portadores de aminas primaria, secundaria (a excepción de los derivados de L-prolina) y terciarias, evaluados *in vitro* en células 3T3 de ratón como vectores no virales de ADN, han mostrado un balance transfección/citocompatibilidad superior o muy superior a los controles comerciales (PLL en el caso de PVP portadora de aminas primarias, y PEI hiperramificada en el caso de las aminas secundarias y terciarias) para un intervalo de funcionalización cercano al 50% molar.
- 5- Copolímeros con tendencia a la alternancia preparados a partir del derivado VPcprol y de la PMI han mostrado alta eficacia como catalizadores de la reacción aldólica asimétrica entre la ciclohexanona y el p-nitrobenzaldehído en agua y a pH 4, obteniendo rendimientos de reacción superiores al 90%, una relación anti/syn de 5:1 y un exceso enantiomérico (ee) superior al 80%. Este comportamiento se ha asociado por una parte a la activación hidrofóbica de la unidad PMI, y por otra a la exclusión de agua a pH 4 (próximo al punto isoeléctrico de los polímeros). La incorporación de pequeños porcentajes molares de metacrilato de PEG como estabilizante coloidal aumenta la velocidad de reacción a pH 4, aunque la enantioselectividad disminuye notablemente, debido probablemente a un desplazamiento del IEP.
- 6- Aprovechando la diferencia de reactividad entre los monómeros de VP y metacrilatos, se obtuvieron materiales “auto-ordenados” a partir de los nuevos derivados de VP sintetizados tras su copolimerización con metacrilatos, en concreto interfaces y superficies de partículas con carga positiva, así como redes anfifílicas hidrolizables y reorganizables en agua.

CONCLUSIONS

Based on the results of the research described in this thesis, the following conclusions have been reached:

- 1- Versatile synthesis routes to obtain multiple VP monomers functionalized with different aliphatic amines: primary, secondary (including L-proline), tertiary, and quaternary have been described for the first time. These monomers have shown to be easily homo- and copolymerizable with VP through simple conventional radical polymerization obtaining the statistic modified polymers in a controlled manner by the “*bottom-up*” technique, yielding polymers with a true PVP backbone.
- 2- The monomer carrying the primary amine group has allowed the development of a synthetic route based on the hydroxylated drugs anchoring by 1,4-Michael addition reaction, obtaining PVP-drug conjugates with the ability of a controlled hydrolysis depending of the pH releasing the active compound. This route has been shown using the bactericidal 2-phenoxyethanol compound as a model drug.
- 3- PVP polymers functionalized by “click” chemistry with cyclic amines (pyrrolidine, piperidine and piperazine) have shown sensitivity to temperature and/or pH in aqueous media, depending on the nature and the composition of the amine group. The PVP polymers functionalized with pyrrolidine and piperidine exhibited this dual sensitivity for the first time in the literature.
- 4- The PVP polymers bearing primary, secondary (other than those carrying L-proline) and tertiary amines were evaluated as non-viral DNA vectors *in vitro* in 3T3 mouse cells. Indeed, these polymers showed a higher or much higher transfection/cytocompatibility balance than commercial controls (PLL in the case of primary amines as functional group, and hyperbranched PEI in the case of secondary and tertiary amines) when the degree of functionalization was around 50 mol%.
- 5- Copolymers with tendency towards alternating composition have been obtained from the VPcprol derivative and PMI, showing high efficiency as catalysts for the asymmetric aldol reaction between cyclohexanone and p-nitrobenzaldehyde in water and pH 4, obtaining reaction yields greater than 90%, anti/syn ratio of 5:1, and an enantiomeric excess (ee) over of 80%. On one hand, this behavior was associated to the hydrophobic activation that the PMI unit presents in the copolymer, while on the other hand it was attributed to water exclusion at pH 4 which is the isoelectric point of the polymer. The incorporation of small amounts of PEG methacrylate as colloidal stabilizer increased the reaction rate at pH 4, but the enantioselectivity decreased significantly, possibly due to a displacement of IEP at lower pH.
- 6- Taking advantage of the differential reactivity of VP and methacrylates monomers, “self-ordered” materials were obtained from the conventional copolymerization of the synthesized novel VP derivatives with methacrylates, specifically interfaces and particles with positively charged surfaces, as well as amphiphilic hydrolysable and reorganized networks.